

Entwicklung biotechnologischer Werkzeuge zur enzymkatalysierten Produktion makrozyklischer Moschusriechstoffe

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Maren Paschke

aus Berlin

Referent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Korreferent: Prof. Dr. Heribert Warzecha (FB Biologie/Botanik, TUD)

Tag der Einreichung: 30. April 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Juli 2012

Darmstadt 2012

D17

„...Irgendwann wird alles gut,
auch wenn man nix dafür tut.
Da glaub ich fest dran,
heut ist schon besser als gestern...”

(Sido - Relax)

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1. MAKROCYCLISCHE MOSCHUSRIECHSTOFFE | 2 |
| 1.1.1. AUFBAU UND SYNTHESE MAKROCYCLISCHER MOSCHUSRIECHSTOFFE | 3 |
| 1.2. ALDOLREAKTIONEN | 4 |
| 1.2.1. ALDOLASEN UND DER KLASSE I ALDOLASE-MECHANISMUS | 5 |
| 1.3. PROTEINSCAFFOLDS | 8 |
| 1.3.1. DIE POLYKETID CYCLASEN SNOAL UND AKNH | 9 |
| 1.3.2. DIE SESQUITERPENE SYNTHASEN ACHISTOLOCHENE UND PENTALENENE SYNTHASE | 11 |
| 1.4. <i>PROTEIN ENGINEERING</i> | 12 |
| 1.5. KATALYTISCHE ANTIKÖRPER | 14 |
| 1.5.1. GEWINNUNG VON KATALYTISCHEN ANTIKÖRPERN | 15 |
| 1.5.2. EINZELDOMÄNEN-ANTI-KÖRPER | 15 |
| 1.6. QUANTIFIZIERUNG DER PRODUKT-BILDUNG DER ALDOLASE-VARIANTEN MITTELS CPDMO | 17 |
| 1.7. ZIELSETZUNG | 18 |
| 2. MATERIALIEN | 20 |
| 2.1. ORGANISMEN | 20 |
| 2.1.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 20 |
| 2.1.2. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> | 20 |
| 2.1.3. PHAGEN | 20 |
| 2.2. PLASMIDE | 20 |
| 2.3. OLIGONUKLEOTIDE | 22 |
| 2.3.1. <i>PRIMER</i> FÜR LYSIN-VARIANTEN | 22 |
| 2.3.2. <i>PRIMER</i> FÜR SNOAL MUTEIN-BIBLIOTHEKEN | 23 |
| 2.3.3. WEITERE <i>PRIMER</i> | 24 |
| 2.4. DNA- UND PROTEINLÄNGENSTANDARDS | 24 |
| 2.5. PUFFER UND LÖSUNGEN | 25 |
| 2.6. KOMMERZIELL ERHÄLTICHE SYSTEME (KITS) | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 2.7. KULTURMEDIENTEN | 27 |
| 2.8. CHEMIKALIEN, ENZYME UND ANTIKÖRPER | 27 |
| 2.9. GERÄTE UND SONSTIGE MATERIALIEN | 30 |
| 2.10. DATENVERARBEITUNGSPROGRAMME | 32 |
| 3. METHODEN | 33 |
| 3.1. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN | 33 |
| 3.1.1. ARBEITEN MIT <i>ESCHERICHIA COLI</i> STÄMMEN | 33 |
| 3.1.2. ARBEITEN MIT <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> | 33 |
| 3.1.3. ARBEITEN MIT PHAGEN | 34 |
| 3.1.4. TRANSFORMATION KOMPETENTER ORGANISMEN MITTELS ELEKTROPORATION | 35 |
| 3.1.5. MAGNETISCHE SORTIERUNG VON PHAGEN MIT IMMOBILISIERTEN SUIZIDSUBSTRAT | 36 |
| 3.1.6. <i>RETRO</i> -ALDOLTEST MIT METHODOL | 37 |
| 3.1.7. ELISA | 37 |
| 3.1.8. IMMUNFLUORESCENZ-MARKIERUNG VON <i>S. CEREVISIAE</i> | 39 |
| 3.1.9. MARKIERUNG DER <i>S. CEREVISIAE</i> SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEK MIT BIOTINYLIERTEN SUIZID-SUBSTRAT | 39 |
| 3.1.10. SORTIERUNG DER <i>S. CEREVISIAE</i> SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEK AM FACS | 39 |
| 3.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 40 |
| 3.2.1. EXTRAKTION UND FÄLLUNG VON DNA | 40 |
| 3.2.2. ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE | 40 |
| 3.2.3. ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PLASMID-DNA AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 41 |
| 3.2.4. BESTIMMUNG VON DNA-KONZENTRATIONEN | 41 |
| 3.2.5. RESTRIKTION UND LIGATION VON PLASMID-DNA | 41 |
| 3.2.6. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) | 42 |
| 3.2.7. SUCROSE-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION | 43 |
| 3.3. PROTEINCHEMISCHE METHODEN | 43 |
| 3.3.1. PRODUKTION VON PROTEINEN | 43 |
| 3.3.2. ZELLAUFSCHLUSS VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 44 |
| 3.3.3. BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN | 44 |
| 3.3.4. ANALYTISCHE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE | 44 |
| 3.3.5. <i>WESTERN-BLOT</i> ANALYSE | 45 |
| 3.4. CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN | 45 |
| 3.4.1. IMAC | 45 |
| 3.4.2. HPLC | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5. CHEMISCHE METHODEN | 46 |
| 3.5.1. SYNTHESE DER SUIZIDSUBSTRATE | 46 |
| 3.5.2. BIOTINYLIERUNG DER SUIZIDSUBSTRATE | 47 |
| 3.5.3. KOPPLUNG DES SUIZIDSUBSTRATS AN ANTIGENE | 48 |
| | |
| 4. ERGEBNISSE | 49 |
| | |
| 4.1. SUCHE NACH GEEIGNETEN PROTEIN- <i>SCAFFOLDS</i> FÜR DIE ZYKLISIERUNG EINES LINEAREN DIKETONS | 49 |
| 4.1.1. AUSWAHL EINES GEEIGNETEN PROTEIN- <i>SCAFFOLDS</i> | 49 |
| 4.1.2. KOLONIERUNG GEEIGNETER PROTEIN- <i>SCAFFOLDS</i> | 49 |
| 4.1.3. UNTERSUCHUNGEN ZUR REKOMBINANTEN EXPRESSION DER PROTEIN- <i>SCAFFOLDS</i> | 50 |
| | |
| 4.2. KONSTRUKTION POTENZIELLER KLASSE I ALDOLASE- <i>SCAFFOLDS</i> DURCH ORTSGERICHTETE INSTALLATION VON LYSINRESTEN | 52 |
| 4.2.1. KONZEPTION, KOLONIERUNG UND EXPRESSION DER LYSINVARIANTEN | 53 |
| 4.2.2. ETABLIERUNG EINES FLUORESCENZBASIERTEN ASSAYS ZUR IDENTIFIKATION AKTIVER LYSINVARIANTEN | 58 |
| | |
| 4.3. ERZEUGUNG VON MUTEINBIBLIOTHEKEN DURCH RANDOMISIERTE MUTAGENESE | 59 |
| 4.3.1. KONZEPTION, KOLONIERUNG UND EXPRESSION EINER SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEK BASIEREND AUF DER LYSINVARIANTE V55K | 59 |
| 4.3.2. KOLONIERUNG UND PRODUKTION EINER SNOAL-PHAGENBIBLIOTHEK | 61 |
| 4.3.3. KONZEPTION, KOLONIERUNG UND ERSTELLUNG EINER SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEK ZUR OBERFLÄCHEN-PRÄSENTATION AUF <i>S. CEREVISIAE</i> | 62 |
| | |
| 4.4. SYNTHESE UND BIOTINYLIERUNG VON <i>SCREENING</i> -SUBSTRATEN | 66 |
| 4.4.1. SYNTHESE DER SUIZIDSUBSTRATE | 66 |
| 4.4.2. BIOTINYLIERUNG UND AUFREINIGUNG DER SUIZIDSUBSTRATE | 66 |
| 4.4.3. UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT DES BIOTINYLIERTEN SUIZID-SUBSTRATS MIT ALDOLASE AK 38C2 | 70 |
| | |
| 4.5. DURCHMUSTERUNG DER SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEKEN | 74 |
| 4.5.1. DURCHMUSTERUNG DER LÖSLICHEN SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEK MIT HILFE EINES FLUORESCENZ-BASIERTEN ASSAYS | 74 |
| 4.5.2. <i>PHAGEDISPLAY-SCREENING</i> DER SNOAL-PHAGENBIBLIOTHEK MIT IMMOBILISIERTEN SUIZID-SUBSTRAT | 74 |
| 4.5.3. DURCHMUSTERUNG DER SNOAL- <i>S. CEREVISIAE</i> MUTEINBIBLIOTHEK AM FACS | 80 |
| | |
| 4.6. DURCHMUSTERUNG VON VHH-ANTIKÖRPER BIBLIOTHEKEN MIT DEM SUIZID-SUBSTRAT AUF DER SUCHE NACH KATALYTISCHEN ALDOLASE-ANTIKÖRPERN | 84 |
| 4.6.1. <i>PHAGE-DISPLAY-SCREENING</i> MIT SYNTHETISCHER UND NAIVER VHH-BIBLIOTHEK | 84 |
| 4.6.2. DURCHMUSTERUNG EINER NAIVEN VHH- <i>S. CEREVISIAE</i> BIBLIOTHEK AM FACS | 86 |
| | |
| 4.7. HERSTELLUNG EINES HAPTEN-KONJUGATS MIT DEM SUIZIDSUBSTRAT ZUR IMMUNISIERUNG EINES LAMAS | 90 |
| | |
| 4.8. AUFBAU EINES FOTOMETRISCHEN ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG DER PRODUKTBILDUNG DER ALDOLASE-VARIANTEN | 93 |

| | |
|--|------------|
| 4.8.1. Klonierung und Expression einer Cyclopentadecanone-Monooxygenase (CPDMO) | 93 |
| 4.8.2. Etablierung eines fotometrischen Assays zur Quantifizierung der Produktbildung der Aldolase-Varianten | 95 |
| 5. Diskussion und Ausblick | 97 |
| 5.1. Diskussion | 97 |
| 5.1.1. Suche nach geeigneten Protein-Scaffolds für die Zyklisierung eines linearen Diketons | 97 |
| 5.1.2. Konstruktion potenzieller Klasse I Aldolase-Scaffolds durch ortsgerichtete Installation von Lysinresten | 99 |
| 5.1.3. Erzeugung von Muteinbibliotheken durch randomisierte Mutagenese | 102 |
| 5.1.4. Synthese und Biotinylierung von Screening-Substraten | 103 |
| 5.1.5. Durchmusterung der SNOAL-Muteinbibliotheken | 104 |
| 5.1.6. Durchmusterung von VHH-Antikörper Bibliotheken mit dem Suizidsubstrat auf der Suche nach katalytischen Aldolase-Antikörpern | 108 |
| 5.1.7. Herstellung eines Hapten-Konjugats mit dem Suizidsubstrat zur Immunisierung eines Lamas | 109 |
| 5.1.8. Aufbau eines fotometrischen Assays zur Quantifizierung der Produktbildung der Aldolasevarianten | 111 |
| 5.2. Ausblick | 112 |
| 6. Zusammenfassung | 114 |
| 7. Literaturverzeichnis | 116 |
| 8. Danksagung | 128 |
| 9. Anhang | 129 |
| 9.1. Abkürzungsverzeichnis | 129 |
| 9.2. Sequenzen | 131 |
| 9.3. Massenspektren | 132 |
| 9.4. Eidesstattliche Erklärung | 135 |

1. EINLEITUNG

Schon in der Frühzeit entdeckten die Menschen Duftstoffe als Opfergabe der Götter oder zur Einbalsamierung ihrer Toten. Zunächst wurden dafür Pflanzenöle oder der Rauch einiger Kräuter verwendet. Mit Beginn des 13. Jahrhunderts gelangten die Kenntnisse zur Herstellung von Duftstoffen in den abendländischen Kulturkreis, als Apotheker und Klostergemeinschaften begannen, sich mit der Untersuchung und Herstellung von Arzneiölen zu beschäftigen (Brauckmann, 1994). Anfang des 19. Jahrhunderts waren erst etwa 150 Duft- und Geschmackstoffe bekannt. Dank der Forschung in den letzten Jahrzehnten in Hinblick der Zusammensetzung natürlicher Duft- und Geschmackskomplexe und die Synthese wichtiger Inhaltsstoffe sowie die Erzeugung künstlicher Riechstoffe sind heute über 4000 Duft- und Geschmacksstoffe geläufig (Brauckmann, 1994).

Im weitesten Sinne zählen alle Substanzen zu den Riechstoffen, die einen wohlriechenden oder unangenehmen Geruch ausströmen. Die geruchliche Eigenschaft des Stoffes ist dabei eine Reaktion des Riechenden. Riechstoffe müssen, um als Geruch wahrgenommen zu werden, leicht flüchtig sein, damit sie sich in der Luft verteilen können. Daher besitzen solche Stoffe meist ein Molekulargewicht von weniger als 300 g/mol und einen relativ hohen Dampfdruck. Sie bestehen häufig aus einem polaren Teil und einer organischen Komponente. Hinzu kommt, dass Enantiomere eines Riechstoffs einen unterschiedlichen Geruch hervorrufen können, da die Geruchsrezeptoren chiral sind (Kraft, 2000).

Die Gewinnung solcher Substanzen ist auch heute noch mit einem erheblichen Aufwand verbunden. So müssen, um ein einziges Kilogramm „Absolue“ aus Jasmin zu gewinnen, rund acht Millionen einzelne Jasminblüten extrahiert werden (Brauckmann, 1998). Daher liegen die Ziele der Forschung vornehmlich in der Synthese preisgünstiger Imitationen, die dem natürlichen Geruch und Geschmack möglichst nahe kommen. Bei den Riechstoffen Ambra und Moschus ist es den Forschern gelungen, chemische Ersatzstoffe zu synthetisieren. Bereits 1888 entdeckte der Explosionsstoff-Chemiker Albert Baur zufällig, dass das Produkt der Friedel-Crafts-Reaktion von Tri-Nitro-Toluol (TNT) mit *tert*-Butyl-Haliden einen angenehmen Moschusgeruch ausströmte (Gautschi, Bajgrowicz und Kraft, 2001). 1926 konnte Leopold Ruzicka die Strukturformel des Muscon aufklären, womit neue Synthesewege der makrozyklischen Riechstoffe erschlossen werden konnten (Ruzicka, 1926). Die Erforschung der Cyclisierungsreaktionen brachte einen weiteren Durchbruch in der Musconsynthese und so konnte die Produktion dank niedriger Preise der Ausgangssubstanzen vom Kilo- auf den Tonnenmaßstab erhöht werden (Gautschi, Bajgrowicz und Kraft, 2001). Die synthetischen Nitro- und Keton-Moschusverbindungen werden auch heute noch in relativ großen Mengen in der Parfümerie verwendet. Es wurde jedoch

festgestellt, dass diese und andere Nitroaromaten nur schlecht biologisch abbaubar sind und somit ökotoxikologische Probleme aufweisen. Daher wird in der Forschung weiterhin nach anderen Wegen gesucht, unbedenkliche Verbindungen mit Moschusgeruch bereitzustellen.

1.1. MAKROCYCLISCHE MOSCHUSRIECHSTOFFE

Moschusriechstoffe sind in der Parfümindustrie besonders hoch angesehen, aber auch sehr teuer. Sie sind anderen Riechstoffen sowohl geruchlich, als auch in ihren fixativen Eigenschaften überlegen und werden daher vorzugsweise in der Kosmetik- und Waschmittelindustrie eingesetzt. Der natürliche Moschusriechstoff wurde früher aus den exokrinen Duftdrüsen des hirschartigen Moschustieres gewonnen. Die Duftdrüsen liegen in der Nähe der männlichen Geschlechtsorgane und produzieren während der Brunftzeit ein extrem stark riechendes Sekret, welches der Markierung ihres Territoriums und der Anziehung der weiblichen Artgenossen über eine große Entfernung dient (Rebmann, 1998). Da das in den Hochtälern des Himalaya angesiedelte Moschustier inzwischen vom Aussterben bedroht ist und aus diesem Grund unter Artenschutz steht, werden heutzutage synthetische Moschusriechstoffe in der Industrie eingesetzt (Rebmann, 1998).

Der natürliche Moschusriechstoff setzt sich aus mehreren chemischen Komponenten zusammen, wobei die geruchsbestimmende Komponente das Muscon darstellt. Bei den synthetischen Moschusriechstoffen unterscheidet man drei Hauptklassen: Polycyclen, Makrocyclen und Nitromoschusverbindungen (Rebmann, 1998). Die Polycyclen sind meist aromatische, nitrofreie Verbindungen, wie AHTN (6-Acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetraline) oder HHCB (1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta(g)-2-benzopyran) (Abbildung 1.1.1). Diese Stoffe gelten jedoch aufgrund ihrer hohen Persistenz und ihrer Bioakkumulation als umweltschädlich (Kuhlich, 2011).

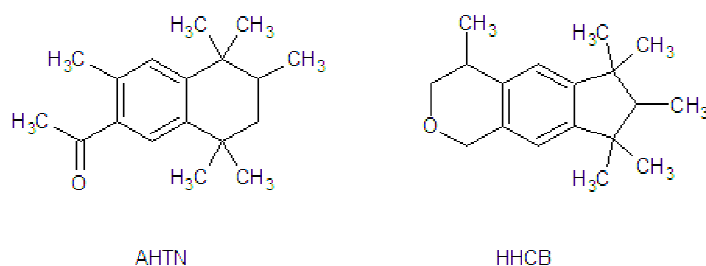


Abbildung 1.1.1.: Strukturen der polycyclischen Moschusverbindungen AHTN und HHCB.

Die Nitromoschusverbindungen, wie Moschus-Xylol oder Moschus-Keton, enthalten eine oder mehrere Nitroverbindungen (Abbildung 1.1.2.) und sind aufgrund ihrer hohen Lipophilie in der Lage, sich in Fettgewebe von Lebewesen anzulagern, wo sie nur schwer abbaubar sind.

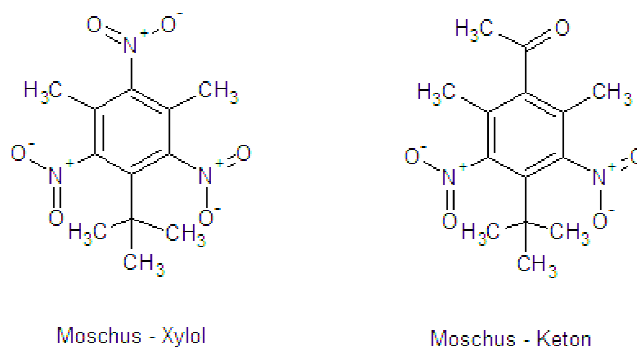


Abbildung 1.1.2.: Strukturen der Nitromoschusverbindungen Moschus-Xylol und Moschus-Keton.

Sie konnten auch in Muttermilch nachgewiesen werden und stehen außerdem in Verdacht cancerogene Eigenschaften zu besitzen (Rebmann, 1998). Die naturidentischen makrocyclischen Moschusriechstoffe sowie strukturell davon abgeleitete, synthetische Verbindungen, wie Muscon, Ambrettolid und Zibeton sind in der Industrie besonders weit verbreitet, aber auch sehr teuer (Abbildung 1.1.3).

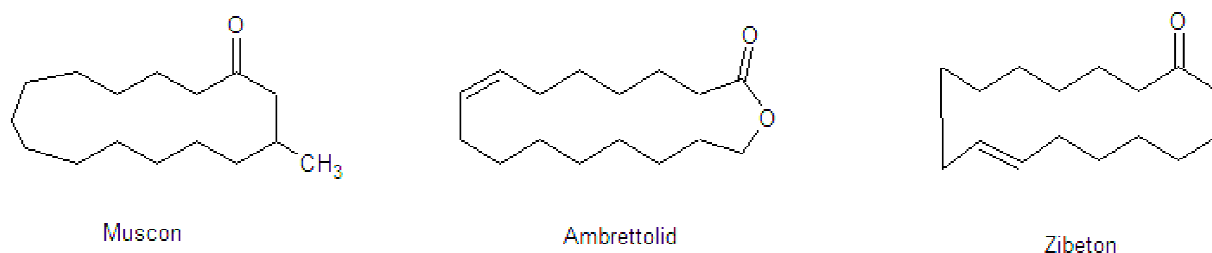


Abbildung 1.1.3.: Strukturen der Makrozyklischen Moschusriechstoffe Muscon, Ambrettolid, Zibeton.

Bei den makrocyclischen Moschusriechstoffen wurde das Ambrettmoschus wegen seiner fotosensibilisierenden Eigenschaften für alle Einsatzgebiete mit Hautkontakt aus dem Verkehr gezogen (Kuhlich, 2011). Vor diesem Hintergrund ist ein weiter stark steigender Bedarf an makrocyclischen Moschusriechstoffen absehbar.

1.1.1. AUFBAU UND SYNTHESE MAKROCYKLISCHER MOSCHUSRIECHSTOFFE

Makrocyclen bestehen aus zwölf-, oder mehrgliedrigen Ringen von Atomen, die sowohl Kohlenstoff, als auch Heteroatome enthalten können (Dietrich, 1993). Dabei können verschiedene Substituenten an den Zyklus gebunden sein. Die Struktur des 15-gliedrigen cyclischen Ketons des Muscons konnte bereits im Jahre 1926 durch Ruzicka aufgeklärt werden (Ruzicka, 1926) (Abbildung 1.1.3.).

Der Biosyntheseweg für Muscon oder vergleichbare Cycloalkanderivate ist bis heute unbekannt und es lassen sich nur potenzielle biogene Vorstufen aus α,ω -Dicarbonsäuren durch doppelte β -Oxidation und Decarboxylierung ableiten (Abbildung 1.1.4.)

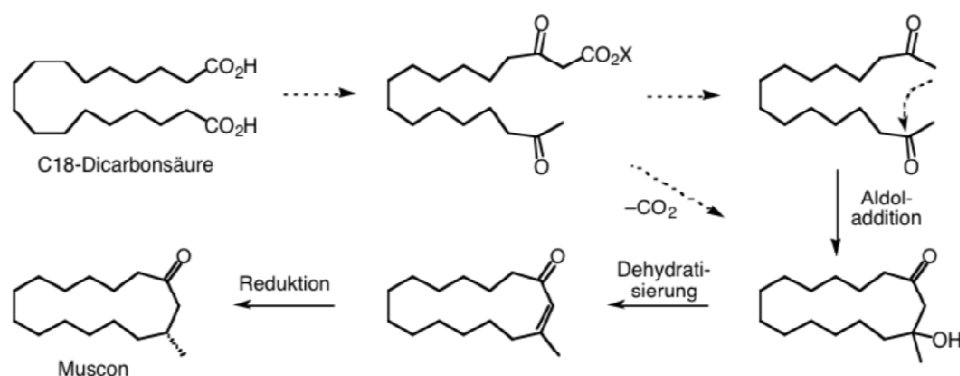


Abbildung 1.1.4.: Schematische Darstellung der hypothetischen Biogenese von Muscon (nach Rabenhorst, 2007).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die benötigten Dicarbonsäuren aus dem Fettsäuremetabolismus heraus abgeleitet werden und die Zyklisierung unter CO₂-Abspaltung erfolgen könnte (Rabenhorst, 2007).

Chemisch wird Muscon über intramolekulare Kondensationsreaktionen wie Aldol-, Dieckmann- oder Acyloinkondensation synthetisiert (Houben-Weyl, 1999). Mit diesen Methoden können allerdings nur in sehr hoher Verdünnung relativ gute Ausbeuten an Makrocyclen erhalten werden, da bei der Zyklisierung großer Ringe die Wahrscheinlichkeit gering ist, dass sich die Enden des noch nicht cyclischen Vorläufers treffen. Außerdem steht die intramolekulare Ringbildung in Konkurrenz mit intermolekularen Reaktionen wie Oligo- oder Polymerisationen zu offenkettigen oder geschlossenen Produkten (Vögtle, 1972).

1.2. ALDOLREAKTIONEN

Ein zentraler Schritt bei der Synthese von Makrocyclen und anderen komplizierten organischen Verbindungen ist das Knüpfen einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung. Im Jahr 2010 erhielten Richard F. Heck, Ei-ichi Negishi und Akira Suzuki den Chemie-Nobelpreis für die Entwicklung eines eleganten Verfahrens zur Verknüpfung von Kohlenstoffatomen mittels Palladium (Heck, Negishi & Suzuki, 2010). Eine bereits seit 1872 etablierte Methode zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen ist die Aldolreaktion. Sie wurde unabhängig voneinander von Charles Adolphe Wurtz und von Alexander Porfyrevich Borodin entdeckt (Wurtz, 1872). Dabei wird das α-Kohlenstoffatom eines enolisierbaren Aldehyds oder Ketons (1) an die Carbonyl-Funktion eines weiteren Aldehyds oder Ketons (2) unter Basen- oder Säurekatalyse addiert. Das resultierende Produkt dieser sogenannten Aldoladdition stellt eine β-Hydroxycarbonyl-Verbindung (3) dar. Die Dehydratisierung der Reaktion verläuft meistens als Gleichgewichtsreaktion während der Addition, wenn die resultierende β-Hydroxycarbonyl-Verbindung noch mindestens ein α-ständiges Wasserstoffatom aufweist. Daraufhin findet eine Eliminierung von Wasser statt, die ein α-, β-ungesättigtes Aldehyd oder Keton (4) liefert. Findet

die geschilderte Dehydratisierung statt und wird nicht unterbunden, so wird die gesamte Reaktion als Aldolkondensation bezeichnet (Abbildung 1.2.1. 1-4)

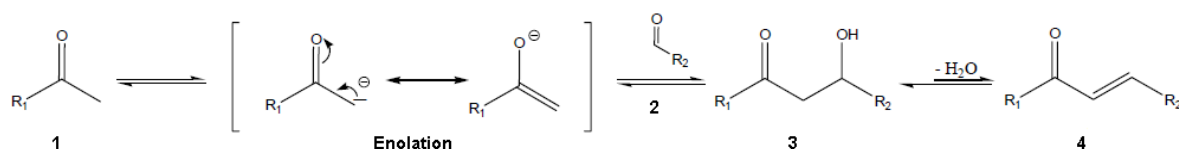


Abbildung 1.2.1.: Mechanismus der Aldoladdition und -Kondensation

Die chemische Synthese von Kohlenstoffverbindungen hat aber zum Teil auch erhebliche Nachteile. So kommt es beispielsweise bei enantiomeren Verbindungen häufig zur Bildung von Racematen. Das ist insofern ein Problem, als das Enantiomere zwar gleiche physikalische, aber oft völlig unterschiedliche physiologische Eigenschaften aufweisen. Dies ist vor allem in der Pharmakologie von Bedeutung, denn zum Beispiel ist der (S)-konfigurierte β-Blocker Propranolol (Betarezeptorenblocker) 100mal stärker wirksam, als das (R)-Enantiomer (Mutschler, 1986). Besonders bei Riechstoffen sind Enantiomere unerwünscht, denn Riechzellen unterscheiden zwischen enantiomeren Duftstoffen entweder unterschiedliche Gerüche oder es wird nur ein Enantiomer wahrgenommen (Kraft, 2000). In Abbildung 1.2.2. sind ein synthetischer polycyclischer Moschusriechstoff und dessen geruchloses Isomer dargestellt.

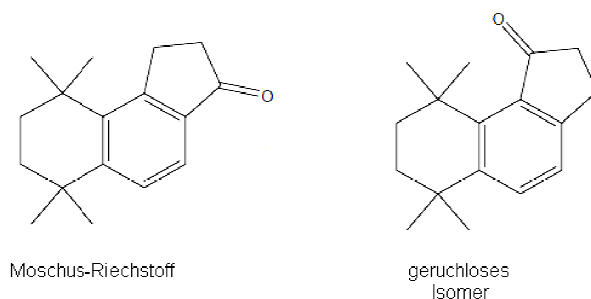


Abbildung 1.2.2.: Struktur eines synthetischen polycyclischen Moschusriechstoffs und dessen geruchloses Isomer.

Die Gewinnung der gewünschten Kohlenstoffverbindungen aus der natürlichen Quelle ist daher oft erwünscht, aber oft auch nur in kleinem Maßstab möglich und beim Beispiel von Muscon so gut wie ausgeschlossen. Deshalb besteht ein in jüngster Zeit häufig beschrittener Ausweg in der biotechnologischen Herstellung von chemischen Substanzen mit Hilfe von Mikroorganismen, Zellkulturen oder gereinigten Enzymen.

1.2.1. ALDOLASEN UND DER KLASSE I ALDOLASE-MECHANISMUS

Enzyme, die in der Lage sind, bei der Biosynthese von Zuckern, Aminosäuren und vielen weiteren wichtigen Stoffwechsel-Metaboliten die Verknüpfung von C-C-Bindungen zu

katalysieren, heißen Aldolasen. Sie sind einige der wenigen Enzyme, die in der Lage sind, eine dafür erforderliche Aldolreaktion zu katalysieren. Bei der enzymatischen Aldolreaktion wird durch stereoselektive Addition ein Ketondonor an einen aldehydischen Akzeptor geknüpft (Walter, 1996; Fessner, 2000). Aufgrund ihrer verschiedenen Substratspezifitäten können die Aldolasen in vier Hauptfamilien unterteilt werden: (1) Pyruvat- und Phosphoenolpyruvat-abhängige Aldolasen, die 3-Desoxy-2-ketosäuren herstellen, (2) Acetaldehyd-abhängige Aldolasen, die 3-Hydroxyaldehyde herstellen, (3) Glycin-abhängige Aldolasen, die β -Hydroxy- α -aminosäuren herstellen und (4) die Familie der Dihydroxyacetonphosphat-abhängigen Aldolasen (DHAP-Aldolasen), welche 2-Keto-3,4-dihydroxyaddukte herstellen (Horecker, 1972). Bei den DHAP-Aldolasen unterscheidet man auf Grund des identifizierten Katalyse-Mechanismus zwischen zwei Aldolase-Klassen (Horecker, 1972).

Klasse I Aldolasen kommen in Tieren und höheren Pflanzen vor und besitzen in der aktiven Tasche ein Lysin. Sie bilden mittels kovalenter Bindung an diesen Lysinrest zunächst ein Imin und daraus ein Enamin, welches als Enolatäquivalent fungiert. Klasse II Aldolasen besitzen stattdessen ein zweiwertiges Metallion wie Mg^{2+} , Zn^{2+} oder Mn^{2+} . Bei ihnen wird das Enolat in der Enzymtasche gebildet, indem das Metallion als Lewisäure dient (Abbildung 1.2.1.). Klasse II Aldolasen sind in Bakterien und Pilzen zu finden.

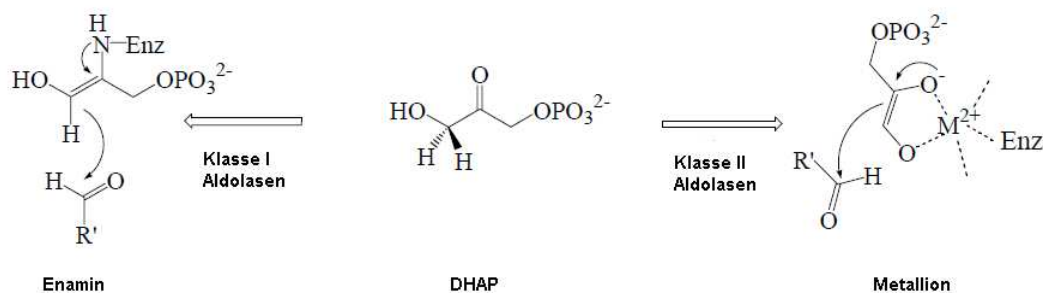


Abbildung 1.2.1.: Die zwei Mechanismen der Dihydroxy-Acetonphosphat (DHAP)-abhängigen Aldolasen.

Am Beispiel der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase wird der Mechanismus der Klasse I Aldolasen genauer beschrieben. Die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase ist an zwei Hauptstoffwechselwegen beteiligt, wobei sie die Umwandlung zwischen sechs- und dreigliedrigen Kohlenstoffeinheiten bewerkstelligt. Die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase ist eine der am besten charakterisierten Aldolasen (Horecker, 1972) und katalysiert in der Gluconeogenese die Aldoladdition einer Ketose (DHAP) und einer Aldose (Glycerinaldehyd-3-phosphat) (Abbildung 1.2.2.). Das Reaktionsprodukt ist die offenkettige Form des Fructose-1,6-bisphosphates (Fru-1,6-P2). Bei dem Stoffwechselweg der Glycolyse wird die umgekehrte Reaktion katalysiert (Horecker, 1972).

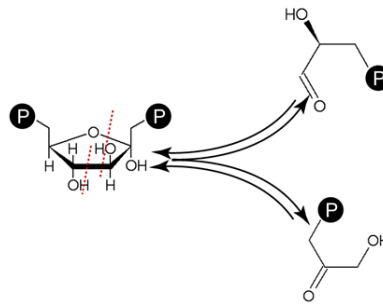


Abbildung 1.2.2.: Schematische Darstellung der Aldolase-katalysierten Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat.

Der Mechanismus der Klasse I Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase wurde ausführlich untersucht und die Zwischenstufen sind gut bekannt (Horecker, 1972). Bei der Verbesserung des Verständnisses der Substraterkennung und der Katalyse haben Strukturuntersuchungen und biochemische Studien weiter geholfen (Choi, 1999; Dalby, 1999). Der Ablauf der Katalyse wurde mit Hilfe von kinetischen Studien genau untersucht und in sieben Stufen eingeteilt. Dabei wurde die Rolle der einzelnen Aminosäuren der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase analysiert und aufgeklärt (Verlinde, 1999; Du, 2011). Abbildung 1.2.3. zeigt schematisch die einzelnen Schritte der Aldolkondensation. Zuerst wird das DHAP-Carbinolamin durch den nukleophilen Angriff eines Lysins am Carbonyl-Kohlenstoff gebildet. Dabei wird das Lysin durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert und das Proton von einem Glutamat-Carboxylat abgefangen. Der Angriff erfolgt auf der *Re*-Seite von C-2 (1). Im zweiten Schritt geht das Enzym mit dem DHAP eine Bindung via Schiffbase ein, indem ein Proton-Austausch stattfindet (2). Die Abspaltung des Protons vom 4-Hydroxyl führt im dritten Schritt zur Bildung des DHAP-Enamins (3). Bei Schritt vier erfolgt die Bildung der Schiffbase von Fructose-1,6-bisphosphat aufgrund der Addition von Glyceraldehyd-3-Phosphat (4). Das Carbinolamin wird im fünften Schritt unter Säure-Katalyse durch Wasser-Addition eines Lysins gebildet (5). Anschließend wird im sechsten Schritt die Bindung zu Lysin aufgehoben wobei Fructose-1,6-bisphosphat gebildet wird (6). Im siebten und letzten Schritt schließt sich, beim Ablösen der Aldolase, der β -Furanose-Ring von Fructose-1,6-bisphosphat und die Reaktion ist beendet (Abbildung 1.2.3. 1-7).

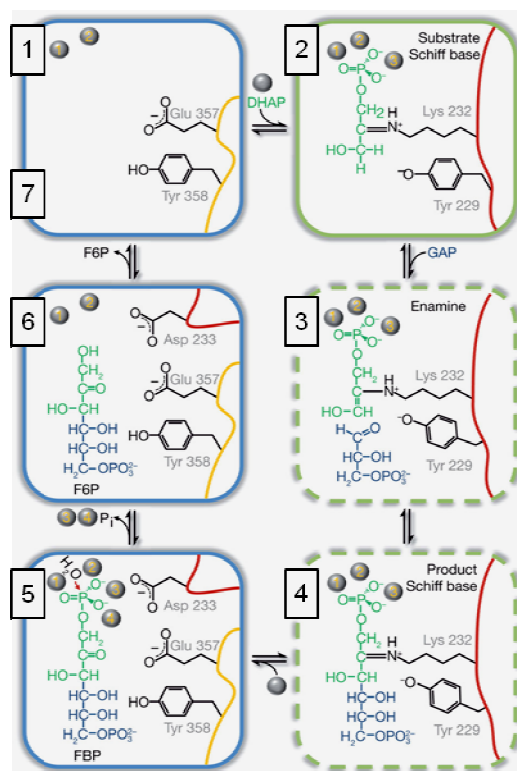


Abbildung 1.2.3.: Postulierter Mechanismus der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase. Die Schritte der Aldolreaktion sind in grünen Kästchen hinterlegt, die Phosphatase-Reaktion in blau. Modifiziert nach Du, 2011.

Die Klasse I Aldolasen haben ein breites Substratspektrum, stellen aber strenge Anforderungen an das Donorsubstrat. So konnten im Gegensatz zu sterisch nicht gehinderten aliphatischen Aldehyden keine aromatischen oder sterisch gehinderten Aldehyde umgesetzt werden. α,β -ungesättigte Aldehyde sind im Allgemeinen ebenfalls keine Substrate für die DHAP-abhängigen Klasse I Aldolasen (Horecker, 1972).

Für die biotechnische Herstellung von makrozyklischen Moschusriechstoffen wäre es denkbar, ein Enzym einzusetzen, das einen Ringschluss nach einem Klasse I Aldolase-Mechanismus durchführt. Eine intramolekulare Addition könnte dadurch erreicht werden, dass die langkettigen aliphatischen Substrate in Abwesenheit von Wasser in einer Enzymkavität mittels Schiffbasen-Bildung aktiviert werden. Allerdings sind bisher keine Makrozyklen-bildenden Enzyme bekannt und bekannte Aldolasen hierfür ungeeignet (Fessner, 2003; 2004).

1.3. PROTEINSCAFFOLDS

Um einen Klasse I-Aldolase-Mechanismus nachzustellen, werden geeignete Proteingerüste gesucht, welche ein weitgehend hydrophobes aktives Zentrum der benötigten Dimension für das C16-Substrat besitzen. Diese Kandidaten sollten in der Lage sein, eine intramolekulare Addition dadurch zu erreichen, dass sie die langkettigen, aliphatischen Substrate in Abwesenheit von Wasser mittels Schiffbasen-Bildung aktivieren. Klasse I Aldolasen können terminale Methylketone als Nucleophil verwenden, wobei die Aktivierung über eine lysingebundene

Schiff'sche Base erfolgt. Als geeignete Enzymkandidaten für ein solches Proteingerüst wären beispielsweise Terpen-Synthasen, Polyketid Cyclasen oder auch mikrobielle P450-Monooxygenasen denkbar. Diese kommen unter anderem aufgrund ihrer bereits vorhandenen zyklisierenden Eigenschaften als passende Startpunkte für eine evolutive Optimierung in Frage. Außerdem besitzen sie ein weitgehend hydrophobes aktives Zentrum mit ausreichend Platz, um ein lineares Kohlenstoffgerüst der Länge C18 als Substrat zu akzeptieren. Zudem sind die Terpen-Synthasen bereits in der Lage, lange, aliphatische Substrate zu binden (Rabenhorst, 2007).

Im nächsten Schritt müsste durch die Einführung eines Lysinrestes im aktiven Zentrum der über Schiffbasenbildung das Substrat bindet und aktiviert, das Proteingerüst zu einem Klasse I Aldolase-Mechanismus funktionalisiert werden. Enzyme, die anhand von Kristallstrukturen strukturell definiert sind, ermöglichen hier ein rasches semi-rationales *Engineering*.

Im Nachfolgenden werden die Proteingerüste aufgeführt, welche aufgrund ihrer zyklisierenden Eigenschaften hierfür geeignet erscheinen. Desweiteren werden katalytische Antikörper vorgestellt, die ebenfalls als Cycloaldol-Katalysatoren dienen können.

1.3.1. DIE POLYKETID CYCLASEN SNOAL UND AKNH

Die Polyketid Cyclase Snoal (*Nogalonic acid methyl ester cyclase*) aus *Streptomyces nogalater* katalysiert den Ringschluss in der Biosynthese des Polyketidantibiotikums Nogalamycin (Sultana, 2004). Aufgrund der vorhandenen Kristallstruktur mit gebundenem Produkt eignet sich das 16,8 kDa große Enzym besonders gut zur ortsspezifischen Mutagenese. Die intramolekulare Aldol-Kondensation von Snoal unterscheidet sich von klassischen Aldolasen, da sie keine Schiff'sche Basen Anordnung oder einen Co-Faktor besitzt (Sultana, 2004). Der unveränderliche Asparat-Rest 121 agiert als Säure-Base Katalysator während der Reaktion. Das dabei auftretende Enolat Intermediat wird hauptsächlich über die Delokalisation des π -Systems stabilisiert. Abbildung 1.3.1. zeigt ein Modell der Polyketid Cyclase Snoal.

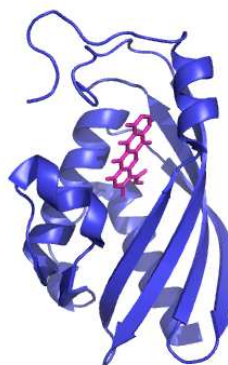


Abbildung 1.3.1.: A: Pymol Modell der Polyketid Cyclase Snoal mit gebundenem Substrat.

Die *Aklanonic Acid Methyl Ester Cyclase* (AknH) ist eine Polyketid Cyclase, die den Ringschluss des vierten Ringes bei der Aclacinomycin-Synthese in *Streptomyces galilaeus* katalysiert (Kallio, 2006). Dieses Enzym ist strukturell und funktionell verwandt zu SnoaL. Beim Umsatz desselben Substrates *Nogalonic acid methyl ester* (NAME) erhält man bei AknH ein C9-R Produkt und bei SnoaL das stereoisomere C9-S Produkt (Abbildung 1.3.2.).

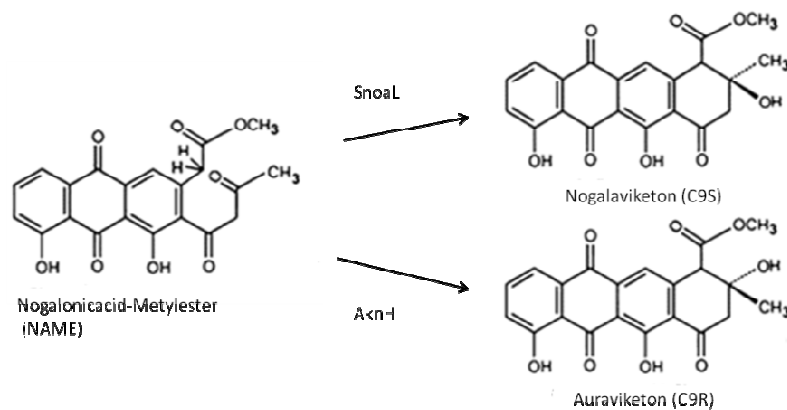


Abbildung 1.3.2.: Strukturen der verschiedenen stereoisomeren Produkte beim Ringschluss von AknH und SnoaL (nach Kallio, 2006)

Ein Vergleich der hoch-aufgelösten Kristallstrukturen und der darauf aufbauenden *in vitro* Mutagenesen der beiden Enzyme führte zu zwei Aminosäure-Substitutionen im aktiven Zentrum, welche die unterschiedliche Stereoselektivität der Produkte hervorrufen. Das Ersetzen der Aminosäurereste Tyr15 und Asn51 von AknH in die entsprechenden Resten (Phenylalanin und Leucin) von SnoaL resultierte in dem Verlust der Stereoselektivität des Produktes (Kallio, 2006). Abbildung 1.3.3. zeigt ein Modell der Polyketid Cyclase AknH.



Abbildung 1.3.3.:Pymol Modell der Polyketid Cyclase AknH mit gebundenem Substrat.

1.3.2. DIE SESQUIUTERPENE SYNTHASEN ACHISTOLOCHENE UND PENTALENENE SYNTHASE

Die Aristolochene Synthase gehört zu den Sesquiterpenoid Synthasen und stammt aus dem filamentösen Pilz *Penicillium roqueforti*. Sie katalysiert die Zyklisierung von Farnesyldiphosphat zu Aristolochene (Abbildung 1.3.4.A) (Proctor und Hohn, 1993; Cane, 1994). Das 38 kDa große, Mg^{2+} abhängige Monomer besitzt eine Asparat-reiche Sequenz (DDVIE), die auf der oberen Wand des aktiven Zentrums lokalisiert ist (Abbildung 1.3.4.B) (Caruthers, 2000).

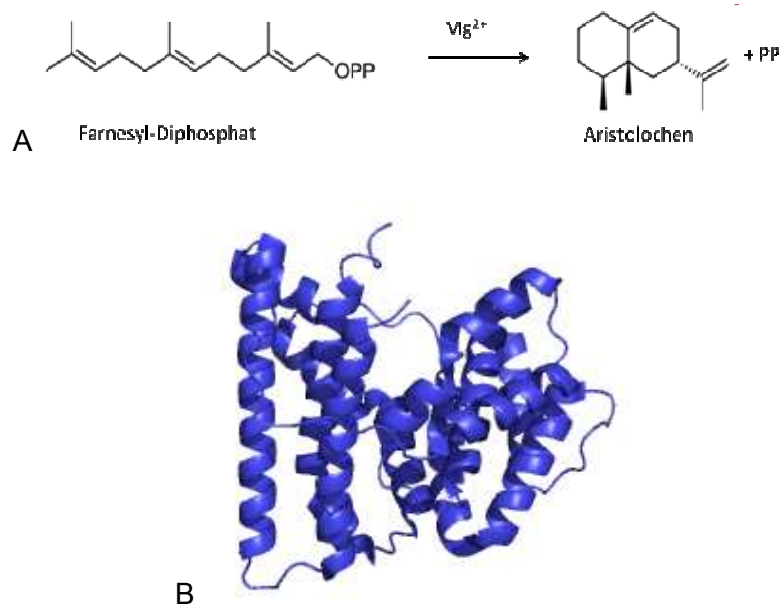


Abbildung 1.3.4.: A: Zyklisierungsreaktion der Aristolochene Synthase (nach Caruthers, 2000). B: Pymol Modell der Aristolochene Synthase.

Die Pentalenene Synthase ist ebenfalls eine Sesquiterpene Synthase, isoliert aus *Streptomyces* UC5319. Sie ist, wie die Aristolochene Synthase, ein 38 kDa großes, Mg^{2+} abhängiges Monomer, welches die Zyklisierung von Farnesyldiphosphat zu Pentalenene katalysiert (Abbildung 1.3.5.) (Seemann, 2002).

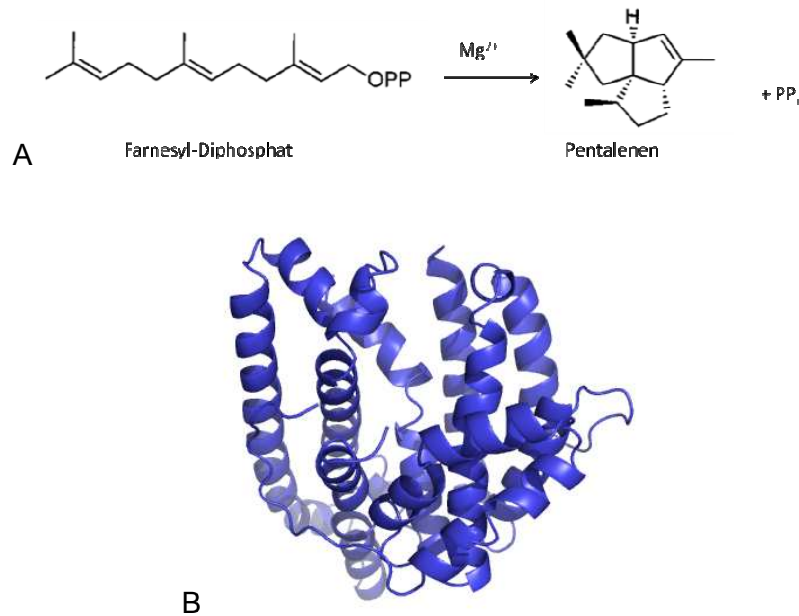


Abbildung 1.3.5.: A: Zyklisierungsreaktion von Farnesyl-Diphosphat zu Pentalenene (nach Seemann, 2004). B: Pymol Modell der Pentalenene-Synthase.

Analog zur Aristolochene-Synthase besitzt sie eine Asparat-reiche Domäne (DDLFD) im vorderen Teil des aktiven Zentrums (Lesburg, 1997). Diese konservierte Region ist bezeichnend für alle Klasse I α -helicalen Terpenoid-Cyclasen (Lesburg, 1997).

Um mit den ausgewählten Proteingerüsten einen Klasse I Aldolase-Mechanismus katalysieren zu können, müsste zunächst eine Funktionalisierung des aktiven Zentrums durch einen eingebauten Lysinrest erfolgen. Dies ist mit Hilfe eines rationalen Protein-Engineering möglich.

1.4. PROTEIN ENGINEERING

Die Konstruktion, bzw. die Modifikation von Proteinen mit veränderten Eigenschaften bezeichnet man als *Protein Design* oder *Protein Engineering* (Pabo 1983, Ulmer 1983). Es wird unterschieden zwischen dem computergestützten rationalen *Protein design* (Richardson, 1989) und dem evolutiven *Protein design*, welches durch zufällig generierte Proteinmodifikationen definiert ist.

Bei dem rationalen *Protein design* ist es von Vorteil, wenn neben der Proteinstruktur auch der Reaktionsmechanismus des zu modifizierenden Enzyms bekannt ist. Dank der Fortschritte in der Aufklärung von Proteinstrukturen mittels Kristallographie und daraus resultierenden Wachstum der Protein-Strukturdatenbanken ist die Kenntnis enorm erweitert worden. Mit Hilfe des sog. *molecular modeling* werden vor allem die Eigenschaften wie Stabilität und Aktivität der gewünschten Enzyme verbessert. Bei unbekannten Proteinstrukturen macht man sich oftmals die Struktur homologer Proteine zu Nutze (Bornscheuer und Pohl, 2001). Bei einer bekannten Proteinstruktur können die Änderungen gezielt in den Computermodellen aber auch *in vivo*

vorgenommen werden (Yang und Withers, 2009). Eine häufig angewandte Methode des rationalen *Protein design* ist die *site directed mutagenesis*. Dabei werden die gewünschten Mutationen auf DNA-Ebene eingebaut und so ein Aminosäure-Austausch, Deletion oder Insertion erreicht (Carter 1986, Kunkel 2001).

Das evolutive *Protein design* wird oft als gerichtete Evolution bezeichnet und stellt ebenfalls eine gängige Methode zur Modifikation von Proteinen dar (Lutz und Patrick, 2004). Durch iterative Runden von Mutation und Selektion werden dabei die Stabilität oder die Aktivität eines Enzyms verbessert, oder anderen Bedingungen wie Substratspezifitäten oder Temperaturen angepasst (Bloom und Arnold, 2009). Da durch den zufälligen Einbau von Mutationen auch Proteine erzeugt werden können, welche nicht mehr korrekt gefaltet sind, muss stets der Einsatz von geeigneten Methoden überprüft werden, die die gewünschten Funktionen und korrekt gefaltete Proteine hervorbringen (Tracewell und Arnold, 2009). Zur Erzeugung möglichst vieler verschiedener Proteinvarianten werden am häufigsten die beiden *in vitro* Methoden der *error prone* PCR (Pritchard, 2005) und das *DNA shuffling* (Stemmer, 1994) eingesetzt. Bei der *error prone* PCR werden Zufallsmutationen im gesamten Genbereich mit Hilfe von Polymerasen ohne *proofreading*-Funktion oder durch die Zugabe von Mn^{2+} - statt Mg^{2+} -Ionen eingeführt (Pritchard, 2005). Bei der Methode des *DNA shufflings* werden durch die Nachahmung der natürlichen homologen Rekombination zwei oder mehrere Gene mit hoher Sequenzhomologie rekombiniert, wodurch eine große Varianz an Proteinen erreicht wird (Bloom und Arnold, 2009).

Bei der Kombination von rationalem *Protein design* und gerichteter Evolution werden anhand von Computermodellen von bekannten Proteinstrukturen gezielt einzelne Aminosäuren ausgewählt und diese auf DNA-Ebene mit Hilfe von degenerierten *Primern* durch Zufallsmutagenese ersetzt. Der Einbau der randomisierten Aminosäuren erfolgt beispielsweise mit Hilfe der Methode der SOE-PCR (*Splicing by overlap extension* PCR) (Horton, 1989). Der Vorteil dieses Verfahrens liegt hauptsächlich in der Erzeugung einer Vielzahl mutagenesegestützter Struktur- und Funktionsbeziehungen. Dieses semi-rationale *Design* wird auch als CAST (*Combinatorial Active-Site Saturation Test*) bezeichnet (Reetz, 2004).

Um Proteingerüste mit einem Klasse I Aldolase-Mechanismus zu erzeugen, könnte es erforderlich sein, neben der ortsgerichteten Installation von Lysinresten auch die Aminosäurereste in der näheren Umgebung zu verändern. Dabei wäre es denkbar, einzelne CAST-Bibliotheken zu erstellen. Anschließend müssen die neuen Proteinvarianten auf die gewünschten Eigenschaften hin durchmustert werden. Dazu ist es erforderlich, eine Selektions-Methode mit der Kopplung zwischen Genotyp und Phänotyp einzusetzen, damit die Zuordnung der selektierten Proteine zu der passenden DNA-Sequenz möglich ist. Viele Oberflächen-*Display*-

Systeme, wie zum Beispiel das *Phage-Display* oder *Yeast-Display* wurden genau für diesen Zweck entwickelt. Auch rekombinante Antikörper-Bibliotheken könnten auf diese Weise durchmustert werden, um katalytische Antikörper mit Klasse I Aldolase-Aktivität zu isolieren.

1.5. KATALYTISCHE ANTIKÖRPER

Antikörper gehören zu der Protein-Klasse der Globuline und werden von B-Lymphozyten (weißen Blutzellen) produziert. Sie fungieren als Abwehrmechanismus des Immunsystems. Antikörper können in fünf verschiedene Klassen (Isotypen) von Immunglobulinen eingeteilt werden. Dazu gehören die Immunglobuline A, D, E, M und G (Padlan, 1994). Antikörper vom IgG-Isotyp sind aus vier Polypeptidketten zusammengefügt und weisen ein Molekulargewicht von etwa 150 kDa auf. Diese Y-förmigen Proteine bestehen aus zwei identischen leichten Ketten (*light chains*, L) und zwei identischen schweren Ketten (*heavy chains*, H) (H2L2). Disulfidbrücken verbinden diese Ketten miteinander. Die jeweiligen Ketten sind in mehrere globuläre Proteinabschnitte, den sogenannten Domänen unterteilt. Innerhalb einer Gruppe von Antikörpern des gleichen Isotyps ist die Aminosäuresequenz der konstanten Domänen identisch. Die Sequenz der variablen Domänen (V-Domänen) kann hingegen sehr unterschiedlich sein (Hamers-Casterman, 1993; Saphire, 2001). In Abbildung 1.5.1. ist die Struktur eines humanen IgG-Antikörpers schematisch dargestellt.

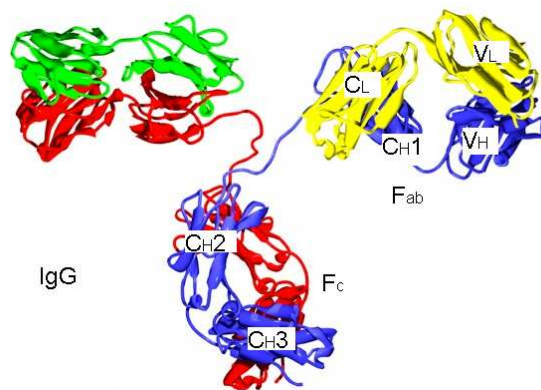


Abbildung 1.5.1.: Schematische Darstellung der Struktur eines humanen IgG. Die schweren Ketten sind in rot und blau dargestellt und die zwei leichten Ketten in gelb und grün. Das Fc-Fragment bildet den Rumpf dieses Ypsilon. Die zwei Antigen-Bindungsstellen befinden sich an den Enden der Fab-Fragmente, die über flexible Gelenkregionen (*hinges*) mit dem Fc-Teil verbunden sind (modifiziert nach Vicker, 2011).

Antikörper besitzen in den variablen Regionen (VL und VH; Abbildung 1.5.1.), wie Enzyme spezifische Substrat-, bzw. Antigen-Bindestellen. Enzyme sind Katalysatoren die durch Bindung des Substrats die Aktivierungsenergie der chemischen Reaktion senken und die Einstellung des Gleichgewichts beschleunigen. Lange Zeit wurde angenommen, dass Antikörper nicht in der Lage sind, die gebundenen Antigene zu verändern. Lerner und Tramontano zeigten 1988 bei Untersuchungen an Myohemerythrin, dass der betreffende Antikörper sein Antigen nicht nur bindet, sondern dessen Struktur auch verändert. Dadurch konnte bewiesen werden, dass

manche Antikörper, ähnlich wie Enzyme, die Aktivierungsenergie herabsetzen und eine chemische Reaktion erleichtern (Tramontano und Lerner, 1988). Solche katalytischen Antikörper, oder auch *Abzyme* (vom engl. antibody Ab - und enzyme) genannt, sind von besonderem Interesse bei Reaktionen, für die keine geeigneten Katalysatoren bekannt sind.

1.5.1. GEWINNUNG VON KATALYTISCHEN ANTIKÖRPERN

Eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Generierung katalytischer Antikörper ist die Immunisierung mit einem Übergangszustands-Analogon oder einer Substrat-ähnlichen reaktiven Substanz. Bereits 1969 postulierte Jenks, dass Antikörper, welche gegen ein solches chemisch stabiles Analogon des Übergangszustands gerichtet sind, die entsprechende Reaktion auch katalysieren (Jenks, 1969). Im Gegensatz zum traditionellen Immunisierungs-Prozess, wird bei der reaktiven Immunisierung ein Suizidsubstrat eingesetzt, das während der Immunisierung eine kovalente Bindung in der Antigenbindungsstelle des Antikörpers eingeht (Wirsching, 1995). Dank der reaktiven Immunisierung konnten bereits *Abzyme* isoliert werden, die enantioselektive Aldolreaktionen und *Retro*-Aldolreaktionen katalysieren (Barbas, 1997; Zhong, 1999). Ein β -Diketon diente hierbei als Suizidsubstrat für eine Lysineinheit des Antikörpers. Da das Immunsystem von Säugetieren keine Antikörper gegen niedermolekulare Substanzen generiert, müssen sogenannte Haptene zunächst an immunogene Trägerproteine gekoppelt werden, um eine Immunantwort hervorzurufen. Erst der Komplex aus Protein und gebundenen Hapten kann als vollwertiges Antigen fungieren (Wagner, 1995; Wirsching, 1995). Eines der am meisten eingesetzten Hapten-Carrier ist das *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH). Dieser hochmolekulare Proteinkomplex aus der Hämolymphe der Großen Kalifornischen Schlüssellochnapfschnecke (*Megathura crenulata*) gehört mit einer Molekülmasse von 8-32 Millionen zu den größten bekannten Proteinen und ist stark immunogen (Hoffmann, 1998; List, 1998).

Neben der Immunisierung bieten naive und synthetische Antikörperbibliotheken eine weitere Möglichkeit hochaffine Antikörpermoleküle mit der gewünschten Spezifität und katalytischen Eigenschaften zu selektieren. Bereits 1994 konnten Smiley und Bencovic, sowie Janda auf diese Weise einige katalytische Antikörper gewinnen (Smiley und Bencovic, 1994; Janda 1994). Dabei ist es wichtig, geeignete *Screening*-Methoden zu etablieren und eine Kopplung zwischen Genotyp und Phänotyp zu gewährleisten. Als vielversprechende Kandidaten für einen solchen Ansatz könnten die nachfolgend beschriebenen Schwere-Ketten-Antikörper dienen.

1.5.2. EINZELDOMÄNEN-ANTI-KÖRPER

Die sogenannten Schwere-Ketten-Antikörper (*heavy chain only antibodies*, HcAbs) besitzen keine leichten Ketten und den schweren Ketten fehlt die CH1-Domäne (Hamers-Casterman, 1993; Shiroishi, 2001). Es konnten bei den Mitgliedern der Familie der *Camelidae* Schwere-Ketten-

Antikörper gefunden werden. Diese sind die einzigen Säugetiere, die neben den konventionellen Antikörpern über eine solche Art von Antikörpern verfügen (Van der Linden, 2000). Evolutionsgeschichtlich unabhängig entwickelt von den kameliden HcAbs, wurden auch beim Ammenhai (*Ginglymostoma cirratum*) (Greenberg, 1995), Wobbegong (*Orectobulus maculatus*) (Streltsov, 2004) und der gefleckten Seeratte (*Hydrolagus colliei*) (Rast, 1998) HcAbs entdeckt. Sie werden als „New Antigen-Rezeptor“ (NAR) oder IgH (*Immunoglobulin heavy chain*) bezeichnet. Abbildung 1.5.2. zeigt schematisch die signifikanten Unterschiede zwischen konventionellen Antikörpern, Schwere-Ketten-Antikörper und Einzeldomänen-Antikörper (VHHs).

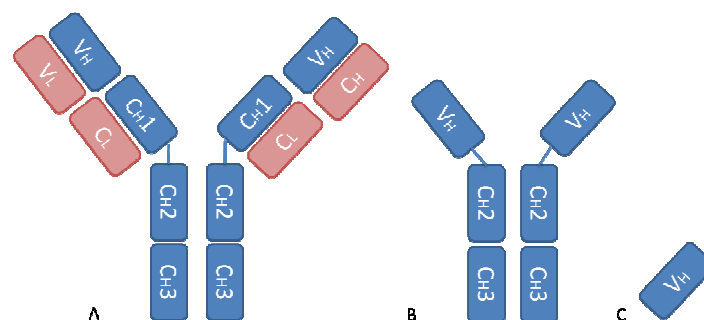


Abbildung 1.5.2.: Schematische Darstellung von A: IgG, B: HcAbs und C: VHH im Vergleich.

1999 konnte geklärt werden, dass das Fehlen der CH1-Domäne auf eine Mutation zurück geht, die zum Verlust eines Donor-Spleiß-Signals am 3'-Ende des CH1-Exons geführt hat (Nguyen 1999; Woolven, 1999). Dabei wird dieser Verlust zugleich auch als Grund für die Abwesenheit der leichten Kette postuliert, da die Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette, nicht mehr gebildet werden kann. Die variablen Domänen der HcAbs, welche als Einzeldomänen-Antikörper oder kurz VHHs (*variable domaine of the heavy chain of heavy chain only antibodies*) bezeichnet werden, weisen zusätzlich Mutationen in der FR2-Region auf, welche bei konventionellen Antikörpern den hydrophoben Kontakt mit VL-Domänen herstellt (Muyldermans, 1994; Vu, 1997). Aus diesem Grund wird die Löslichkeit der VHHs erhöht und somit eine Aggregation verhindert. Die lange hypervariable CDR3-Region, mit einer durchschnittlichen Länge von 16 Aminosäuren, ist eine weitere besondere Eigenschaft der VHHs (Koch-Nolte, 2007). Bei Dromedaren konnte außerdem beobachtet werden, dass einige VHHs eine zusätzliche Disulfidbrücke zwischen CDR1 und CDR3 besitzen und Lamas oftmals zwischen CDR2 und CDR3. Untersuchungen konnten beweisen, dass dies die Stabilität der langen CDR3s unterstützt (Vu, 1997; Koch-Nolte, 2007).

Aufgrund der oben genannten Vorteile der VHH-Antikörperfragmente, wie erhöhte Löslichkeit verminderte Aggregation und besondere Stabilität durch Disulfidbrücken, kommen sie bei den bekannten Oberflächendisplay-Methoden *Phage*- und *Yeast-Display* bereits zum Einsatz (Dolk,

2005; Harmsen und De Haard, 2007). Allerdings gibt es erst wenig Literatur über katalytische VHHs (Li, 2012), es wäre jedoch denkbar, vorhandene VHH-Bibliotheken nach Bindungsmolekülen gegen den Übergangszustand der Cycloaldol-Kondensation zu durchmustern.

Die dem Arbeitskreis zur Durchmusterung zu Verfügung stehenden Antikörperbibliotheken präsentieren die variablen Domänen von kameliden Schwere-Ketten-Antikörpern auf der Oberfläche von Bakteriophagen oder Hefezellen. Bei der ersten Phagen-Bibliothek (Habicht, 2007) handelt es sich um eine voll-synthetische VHH-Bibliothek. Sie besteht aus 72 Unterbibliotheken, bei den alle drei CDR-Regionen vollständig randomisiert sind. Zur Gewährleistung der Genotyp-Phänotyp-Kopplung sind die synthetischen VHH-Varianten in einen *Phagemid* kloniert und werden als pIII-Fusionsprotein auf der Oberfläche von den M13 Bakteriophagen präsentiert (Habicht, 2007). Die Bibliothek besteht aus einer Anzahl von ca. 2×10^8 verschiedenen funktionellen Phagen. Die zweite VHH-Phagen-Bibliothek besteht aus naiven VHH-Antikörperdomänen, die aus Lama-Blut isoliert und aufgearbeitet wurden. Die Gene der VHH-Domänen wurden ebenfalls in einen *Phagemid* kloniert und werden somit auch als pIII-Fusionsprotein auf der Oberfläche von M13 Bakteriophagen präsentiert. Die Bibliothek umfasst ca. 3×10^9 verschiedene funktionelle Phagen. Desweiteren wurde aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Kolmar (TU-Darmstadt) eine naive VHH-Bibliothek bereitgestellt, die auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* präsentiert wird. Diese aus drei Unterbibliotheken bestehende *library* setzt sich aus 5×10^8 funktionellen Klonen zusammen.

1.6. QUANTIFIZIERUNG DER PRODUKTBILDUNG DER ALDOLASE-VARIANTEN MITTELS CPDMO

Für die in der Folgephase nötige Enzymoptimierung soll ein kontinuierlicher Test etabliert werden, bei dem die Produktbildung der Aldolasevarianten quantifiziert werden soll. Zum Nachweis des Reaktionsablaufs könnte ein Cofaktor-abhängiges an die Produktbildung gekoppeltes Signal dienen. Für den Umsatz der Primärprodukte der Aldolcyclisierung bietet sich hierfür eine gekoppelte NADPH-abhängige Baeyer-Villiger-Oxidation an (Abbildung 1.6.1.). Eine Oxygenase mit hoher Substratspezifität für Cyclopentadecanon ist die seit Kurzem bekannte Cyclopentadecanone Monooxygenase (CPDMO) (Iwaki, 2006). Die zusätzliche Funktionalisierung des Substrats mit einem tertiären Alkohol sollte das Enzym tolerieren können (Taschner, 1988).

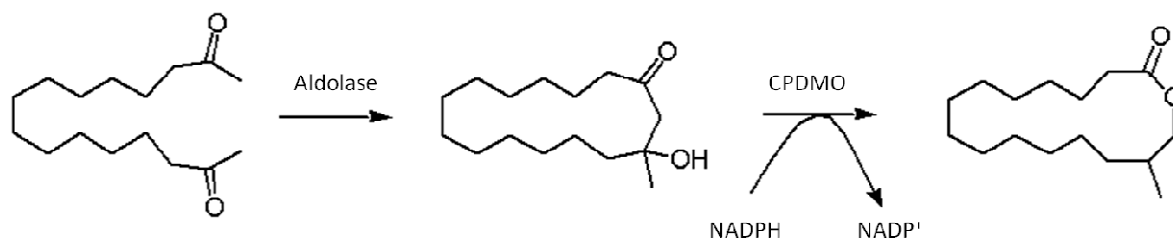


Abbildung 1.6.1.: Schema des gekoppelten Assays der Aldolcyclisierung.

Die CPDMO aus dem Organismus *Pseudomonas* sp. ist ein 64 kDa großes monomeres Enzym, welches die Cofactoren NADPH und FAD benötigt. Sie ist in der Lage, ringförmige Substrate wie C11 oder C15 Ketone zu katalysieren und auch Methyl-substituierte C5 und C6 Ketone, sowie bicyclische Ketone passen in ihr Substratspektrum (Iwaki, 2006). Zudem besitzt sie eine außergewöhnliche Enantioselektivität ($E > 200$) und eine 99%ige *S*-Selektivität gegenüber dem Substrat 2-Methylcyclohexanon (Iwaki, 2006).

1.7. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, auszuloten, inwieweit es möglich ist, einen neuen Zugang zu einer biotechnischen Produktion von makrozyklischen Moschusriechstoffen zu etablieren. Die Motivation lag dabei darin, dass die natürliche Quelle des makrozyklischen Ketons Muscon, das inzwischen vom Aussterben bedrohte Moschustier unter Artenschutz steht und somit das gewünschte Zielmolekül heutzutage chemisch synthetisiert wird. Da dies jedoch auf der Grundlage von petrochemischen Grundchemikalien geschieht, entspricht es nicht nur den Verbrauchervünschen einen kostengünstigen, alternativen und von fossilen Rohstoffen unabhängigen Produktionsprozess zu entwickeln.

Um dies zu bewerkstelligen, sollte ein experimenteller Zugang zur Isolierung von Proteinvarianten gefunden werden, welche in der Lage sind die Zyklisierung eines langkettigen linearen Diketons über eine Aldoladdition zu katalysieren. Durch Kombination von rationalem *Design* und gelenkter Evolution sollte ein geeignetes Proteingerüst identifiziert werden.

Als Startgerüste für eine evolutive Optimierung wurden Enzyme aus der Familie der Polyketid Cyclasen und Terpen-Synthasen ausgewählt, deren Kristallstrukturen bereits bekannt sind, so dass ein rasches semi-rationales *Engineering* möglich ist. Diese potenziellen Enzym-Kandidaten katalysieren bereits eine Zyklisierungsreaktion und verfügen außerdem über ein weitgehend hydrophobes aktives Zentrum der benötigten Dimension, um ein lineares Kohlenstoffgerüst der Länge von C16 zu zyklisieren.

Mit Hilfe von rationalem *Protein-Design* und durch Einführung eines Lysinrestes im aktiven Zentrum sollte der Mechanismus einer Klasse I Aldolase nachgestellt werden. Eine

intramolekulare Addition sollte dadurch erreicht werden, dass das langkettige aliphatische Substrat in Abwesenheit von Wasser in der Enzymkavität mittels Schiffbasen-Bildung aktiviert wird.

Für weitere Optimierung der Aldolase-Aktivität sollten durch genetische Teilrandomisierung ausgewählter Positionen im und am aktiven Zentrum CAST-Bibliotheken (Muteinbibliotheken) erstellt werden. Die ca. 4-6 simultan randomisierten Aminosäurepositionen befinden sich dabei in unmittelbarer Nähe der eingeführten Lysinreste.

Zur Identifizierung der potenziell aktiven Varianten wurde eine Mechanismus-orientierte reaktive Markierung der vermeintlichen Katalysatoren mittels Suizid-Substrat geplant. Dabei eignen sich für den Abfang Schiffbasen-aktiver Lysinreste insbesondere 2,4-Diketone, da die Kondensate irreversibel gebildet werden. Zur Signaldetektion und selektiver Sorption sollten die Suizidsubstrate durch Biotinylierung markiert werden und damit das Durchmustern von Phagenbibliotheken und Bibliotheken auf der Oberfläche von Hefezellen ermöglicht werden.

Für eine weitere Quantifizierung der Produktbildung der Aldolasevarianten sollte ein kontinuierlicher Assay etabliert werden, der ein Cofaktor-abhängiges, an die Produktbildung gekoppeltes Signal liefert. Eine gekoppelte NADPH-abhängige Baeyer-Villiger-Oxidation bietet sich hierbei für die Primärprodukte der Aldolcyclisierung an. Die Cyclopentadecanone Monooxygenase (CPDMO) erfüllt aufgrund ihrer hohen Substratspezifität alle nötigen Anforderungen (Iwaki, 2006).

Parallel dazu sollte versucht werden, die Aldolreaktion durch katalytische Antikörper zu vermitteln. Auf der Suche nach derartigen Antikörpern sollten kamelide VHH-Bibliotheken auf der Oberfläche von Bakteriophagen und Hefezellen mit dem biotinylierten Suizidsubstrat durchmustert werden.

2. MATERIALIEN

2.1. ORGANISMEN

2.1.1. *ESCHERICHIA COLI*

BL21 (DE3) (Studier and Moffatt, 1986)

F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

ER2738 (New England Biolabs)

[F['] proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(Tet^R)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5]

TOP10 (Fa. Invitrogen)

F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG]

2.1.2. *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

EBY100 (Boder, 1997)

[MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL]

2.1.3. PHAGEN

M13-vcs-Helferphage (Stratagene)

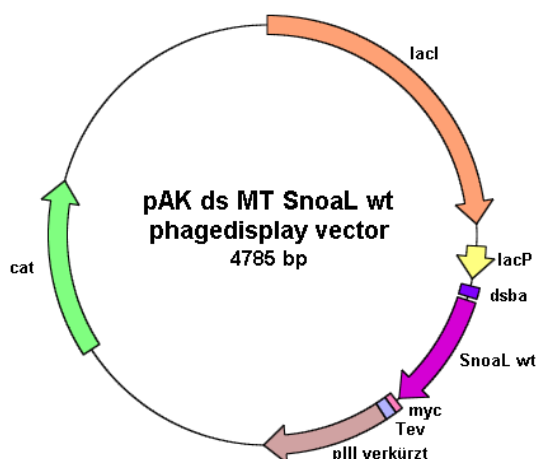
2.2. PLASMIDE

pAKds-MT

Genetische Karte des Plasmides pAKds-MT SnoaLwt.

Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der Elemente an. *cat*: Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase, *lac* P/O: Promotor/Operator-Region des Laktose-Operons, *lacI*: kodierende Sequenz für den *Escherichia coli* lac Repressor, *dsba*: dsba-Signalsequenz, SnoaLwt: Wildtyp von SnoaL

Varianten: pAKds-MT SnoaL-mut
pAKds-MT SnoaL-V55K
pAKds-MT SnoaL-N33K
pAKds-MT SnoaL-H107K
pAKds-MT AknHwt

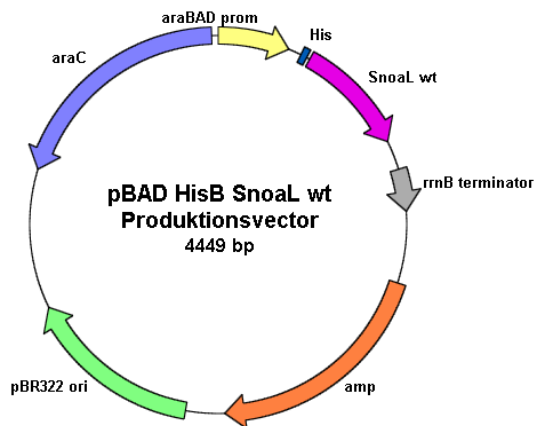


pAKds-MT AknH-L83K
pAKds-MT AknH-V92K
pAKds-MT AknH-T128K

pBAD

Genetische Karte des Plasmids pBAD HisB SnoaLwt.

Die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente sind durch Pfeile dargestellt. amp: Kodierende Sequenz für die β -Lactamase, araBADprom: Promotor-Region des Arabinose-Operons, araC: Transkriptionsregulator des Arabinose-Operons, Enterokinase recognition: kodierende Sequenz für die Enterokinase Erkennungs-stelle, H6: Kodierende Sequenz für ein Hexahistidin Polypeptid, pBR322 origin: Replikationsursprung des Vektors pBR322, rrnB terminator: Transkriptionsterminator-Region, SnoaL: Kodierende Sequenz für die SnoaL like Polyketid-Cyclase, Xpress-epitop: Kodierende Sequenz für das Xpress-Epitop

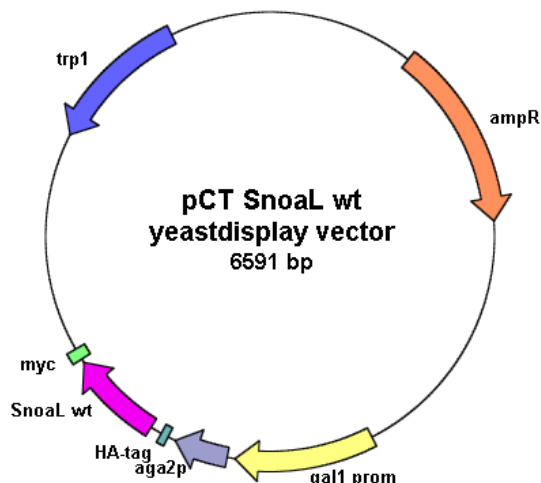


Varianten: pBAD SnoaL-V55KmutI
pBAD SnoaL-V55K
pBAD SnoaL-N33K
pBAD SnoaL-H107K
pBAD AknH wt
pBAD AknH-L83K
pBAD AknH-V92K
pBAD AknH-T128K
pBAD PS wt
pBAD PS-I177K
pBAD PS-N219K
pBAD PS-V301K

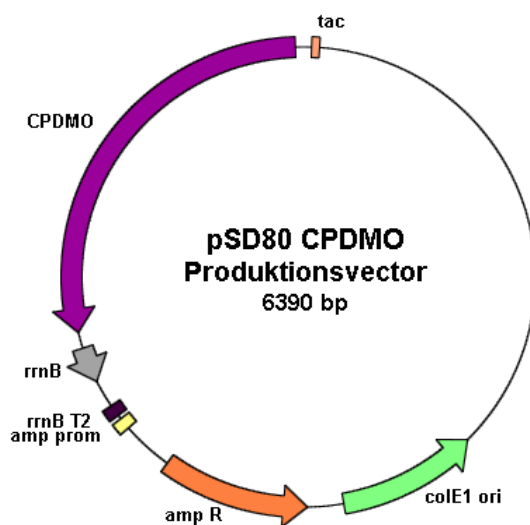
pCT

Genetische Karte des Plasmids pCT-SnoaLwt.

AmpR: Gen der β -Lactamase Gal1 Promotor: Galaktosepromotor, Aga2p: Gen des Aga2p, HA tag: Sequenz des Hämagglutinin Epitops, c-Myc tag: Sequenz des cmc Epitops, Trp1: Gen des Auxotrophiemarkers Phosphoribosyl-anthranilate Isomerase. SnoaL: Kodierende Sequenz für die SnoaL like Polyketid-Cyclase



Varianten: pCT SnoaL-mutII



pSD80 (Smith, 1996)

Genetische Karte des Plasmids pSD80-CPDMO:

Der pSD80 Vektor ist die dritte Generation des kommerziell erwerblichen pKK223-3 Vektors (Pharmacia).

Die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente sind durch Pfeile dargestellt. Amp R: Kodierende Sequenz für die β -Lactamase, tac: tac-Promotor-Region, rrnB terminator; CPDMO: Gen der Cyclopentacecanone Monooxygenase. ColE1-ori: relaxierte Replikation für *multicopy* Plasmide

2.3. OLIGONUKLEOTIDE

2.3.1. PRIMER FÜR LYSINVARIANTEN

| | |
|----------------|--|
| SnoaL SfiI up | 5`-gtcctcgcaactgcggcccagccggcctctcgtcagacagatc |
| SnoaL SfiI lo | 5`-gcgtttctgggtgggccccgaggccgacggacgccagccctcg |
| SnoaL N33K up | 5`-caccccgactacctaaccggccaccttgga |
| SnoaL N33K lo | 5`-ttccaaggtggccggttgaggtagtcgggggtg |
| SnoaL V55K up | 5`-gccagctggctggctggaaacgggacgagcttc |
| SnoaL V55K lo | 5`-gaacgtcgccggtttccagccgaccagctgggc |
| SnoaL H107K up | 5`-ttctccggtgaacaggtgaaactgatgcgcacgctc |
| SnoaL H107K lo | 5`-gacgatgcgcacgagttcacctgttcaccggagaa |
| AknH SfiI up | 5`-gtcctcgcaactgcggcccagccggccgagcagatagcggc |
| AknH SfiI lo | 5`-gcgtttctgggtgggccccgaggccgaggacggcggtgctc |
| AknH L83K up | 5`-gccggctgggtgaaatacggccggcac |
| AknH L83K lo | 5`-gtgccggccgtatttcaccagccgggc |

| | |
|---------------|---|
| AknH V92K up | 5`-gtcggtagatgaaaggcatggcgccg |
| AknH V92K lo | 5`-cggcgccatgcctttcatctcaccgac |
| AknH T128K up | 5`-gactaccagggcaaataccgccagctc |
| AknH T128K lo | 5`-gagctggcggtatttgcctggtagtc |
| PS SfiI up | 5`-gtcctcgcaactgcggcccagccggccatgcctcaa |
| PS SfiI lo | 5`-gcgtttctgggtgggccccgaggccgaatgagc |
| PS I177K up | 5`-cgccatacaaaaggagtacag |
| PS I177K lo | 5`-ctgtactcctttgtatggcg |
| PS N219K up | 5`-ctgctgctgaaagatatcgcc |
| PS N219K lo | 5`-ggcgatatctttcagcagcag |
| PS V301K up | 5`-gtccgtacaaaattcgtggt |
| PS V301K lo | 5`-accacgaattttgtacggac |

2.3.2. PRIMER FÜR SNOAL MUTEINBIBLIOTHEKEN

| | |
|--------------------------------|--|
| Snoal V55K mut 59 63 up | 5`-gtcggctggaaacgggacggnnstccgaggaann scgcctg |
| Snoal V55K mut 48 51 lo | 5`-cgtcgcccgtttccagccgacsnnctgggcsnncgcctt |
| Snoal 2a H107mut up | 5`-cgcttctccggtgaacagggtgnnsctgatgcgc |
| Snoal 2a H107mut lo | 5`-cacctgttcaccggagaagcg |
| Snoal 2a D121mut F125K up | 5`-gggaagatccgcgaccaccggnnstggcccagacaaa cagggg |
| Snoal 2a D121mut F125K lo | 5`-ccggtggtcgcggtatcttccc |
| Snoal 2b H39mut up | 5`-ctcaatccggccaccttgaannssggcatccacaccggg ccc |
| Snoal 2b H39mut lo | 5`-ttccaaggtggccggttag |
| Snoal 2b W54K V55mut T58mut up | 5`-gcgttcgcccagctggtcggaannscggcggnnsttc tccgaggaagcc |
| Snoal 2b W54K V55mut T58mut lo | 5`-gccgaccagctgggcgaacgc |

| | |
|-------------------------|---|
| SnoaL 2b F125A up | 5`-tgccccgacgcgcaggggacg |
| SnoaL 2b F125A lo | 5`-cgtcccctgcgcgtcgggcca |
| SnoaL 2c F101mut up | 5`-atgccgcccaccgaccggcgcnstccggtgaacag gtg |
| SnoaL 2c F101mut lo | 5`-gcgccggtcggtagggcgcat |
| SnoaL 2c F125A T128K up | 5`-gaccaccgggactggcccgcgcaggggaaactg cgccag |
| SnoaL 2c F125A T128K lo | 5`-gtcgggccagtcggtggc |
| SnoaL pCT OL Sfi up | 5`-ggtaggtggtggttctgtagcgcgccagccggcc agatctctgtag |
| SnoaL pCT OL Sfi lo | 5`-aataagctttgttcggatccggccccgaggccgagg accca |

2.3.3. WEITERE PRIMER

| | |
|----------------------|---|
| CPDMO Hind up neu | 5`-gcgcgcaagctttaacaggaggaattaacctatggcatct caactgatccaagaacca |
| CPDMO His Eco lo neu | 5`-gcgcgcaattcttaattggtgatggtgatggtggccgcgttta cgttgctggaactgagc |
| CPDMO Eco lo neu | 5`-gcgcgcaattcttagccgcgtttacgttgctggaactgagc |

2.4. DNA- UND PROTEINLÄNGENSTANDARDS

Die verwendeten Protein- und DNA-Längenstandards wurden von Fermentas *Life Sciences* (Burlington, Kanada) bezogen.

| | |
|--|---|
| <i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i> | relative Molekulargewichte: 14400, 18400, 25000, 35000, 45000, 66200, 116000. |
| <i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i> | relative Molekulargewichte: ~10000, ~15000, ~25000, ~35000, ~40000, ~50000, ~70000, ~100000, ~130000, ~170000. |
| <i>λ DNA/Eco47I (AvaII) Marker, 13</i> | Fragmentlängen in bp: 8126, 6555, 6442, 3676, 2605, 2555, 2134, 2005, 1951, 1612, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 345, 398, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 72, 67, 45, 42, 32, 28, 23. |

2.5. PUFFER UND LÖSUNGEN

| | |
|--|--|
| Alkalische Phosphatase Reaktions-Puffer | 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ |
| Ammoniumacetat-Stammlösung zur DNA-Fällung | 7 M Ammoniumacetat in Wasser |
| Ampicillin-Stammlösung | 100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser, sterilfiltriert |
| Anhydrotetracyclin-Stammlösung | 2 mg/ml Anhydrotetracyclin in N,N'-Dimethylformamid |
| APS-Stammlösung | 10 % (v/v) APS in Wasser |
| BCIP-Lösung | 50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- Phosphat-p-Toluidinsalz) in 70 % (v/v) Dimethylformamid |
| Blocking-Puffer | 3 % (w/v) Milchpulver in PBS-Puffer |
| Boratpuffer | 0,1 M Natriumborat (hergestellt aus Borsäure und NaOH), pH 9,1 |
| Chloramphenicol-Stammlösung | 25 mg/ml Chloramphenicol in 96 % (v/v) Ethanol |
| dNTP-Mixture | Je 10 mM dNTP (N = A, C, G, T) in Wasser |
| Ethidiumbromid-Stammlösung (10x) | 10 mg/ml Ethidiumbromid |
| Hoechst-Puffer | 8 M Harnstoff, 200 mM Tris-Base, 200 mM DTT, 2 % (w/v) SDS, 0,15 mM Bromphenolblau |
| Imidazol-Puffer | 1 M Imidazol-HCl, pH 7,8 |
| IPTG-Stammlösung | 0,5 M IPTG in Wasser, sterilfiltriert |
| Kanamycin-Stammlösung | 75 mg/ml Kanamycin in Wasser, sterilfiltriert |
| Laemmli-Puffer | 25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS |
| Meerrettichperoxidase-Stammlösung | 0,375 U/ml Peroxidase in PBS |
| MES-Puffer | 0,1 M MES-NaOH, 0,15 M NaOH pH 6,1 |
| NBT-Stammlösung | 75 mg/ml NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) in 70 % (v/v) Dimethylformamid |

| | |
|---|---|
| PBS-Puffer | 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ |
| PBS Tween-Puffer | 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 0,05 % (v/v) Tween 20 |
| Phagen Fällungspuffer | 20 % (v/v) PEG, 3,3 M NaCl, 1 mM EDTA |
| Phagen Elutionspuffer | 0,2 mM Glycin, 0,2 mM HCl, pH 2,2 |
| Phenol/Chloroform | 1 Vol Phenol/TE, 1 Vol Chloroform |
| Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas) | Blau: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ Grün: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl Orange: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl Rot: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl Gelb: 33 mM Tris-Essigsäure, pH 7,9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat |
| Sammelgelpuffer für SDS- Polyacrylamidgele | 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 10% SDS Stammlösung, 10 % (w/v) SDS in Wasser |
| Sucrosefarbmarker | 60 % (w/v) Sucrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 1x TBE |
| Taq 10x Puffer (MBI Fermentas) | 100 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 500 mM KCl, and 0.8% (v/v) Nonidet P40 |
| TBE-Puffer | 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA |
| Tetracyclin Stammlösung | 10 µL/mL Tetracyclin in 70 % (w/v) Ethanol, bei -20 °C lagern |
| T4-DNA-Ligase-Puffer (MBI Fermentas) | 400 mM Tris-HCl, pH 7,8 bei 25 °C, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM ATP |
| TE-Puffer | 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,0, aus Stammlösungen zusammengestellt |
| Trenngelpuffer für SDS-Polyacrylamidgele | 1,875 M Tris-HCl, pH 8,8 |
| TEV-Protease Reaktionspuffer | 500 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl, 5 mM EDTA pH 7,5 |
| Tris HCl (pH 7,8) | 2 M Tris-HCl, pH Wert wird mit HCl eingestellt |

| | |
|---------------------------|--|
| Wasserstoffperoxid-Lösung | 200 mM Wasserstoffperoxid in destilliertem Wasser |
|---------------------------|--|

| | |
|-----------------------------|---|
| Western Blot-Transferpuffer | 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol |
|-----------------------------|---|

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Pufferlösungen in H₂O bidest. angesetzt.

2.6. KOMMERZIELL ERHÄLTICHE SYSTEME (KITS)

| | |
|---------|--|
| Promega | <i>Wizard® SV Gel and PCR CleanUp System</i> <i>PureYield™ Plasmid Miniprep und Midiprep System</i> |
|---------|--|

2.7. KULTURMEDIEN

| | |
|--------------|--|
| dYT | 1 % (w/v) Hefe-Extrakt 1,6 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut 0,5 % (w/v) NaCl |
| LB | 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut 1 % (w/v) NaCl |
| Agar-Platten | + 1,5% Agar |
| YPD | 2 % (w/v) Glukose, 2 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt |
| SD | 2 % (w/v) Glukose, 0,67 % (w/v) Difco™ Yeast Nitrogen Base, 0,5 % (w/v) Bacto™ Casamino Acids, 0,54 % (w/v) Na ₂ HPO ₄ and 0,856 % (w/v) NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O |

2.8. CHEMIKALIEN, ENZYME UND ANTIKÖRPER

| | |
|---|-----------------------------------|
| 2-Propanol | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Aceton | Merck KGaA, Darmstadt |
| Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Rotiphorese Gel 30 | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |

| | |
|--|---|
| Agar | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Aldolase-Antikörper 38C2 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ammoniumacetat | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Int. Biotechnologies Inc. New Haven (USA) |
| Ampicillin-Dinatriumsalz | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Anti-cMyc-tag AK | Prof. Dr. P. Friedl, TU Darmstadt |
| Anti-Maus-Biotin AK | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Anti-Maus-Peroxidase AK | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Anti-pVIII AK | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Bacillol plus | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Biotin Sulf-NHS-LC-LC | Thermo Scientific (Rockford, USA) |
| Biotin-Amin (PEG2) | Thermo Scientific (Rockford, USA) |
| BugBuster™ | Novagen, USA |
| Chloramphenicol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Chloroform | AppliChem, Darmstadt |
| D(+)-Saccharose | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| di-Kaliumhydrogenphosphat | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| dNTP Set | Invitek, Berlin |
| DMF (Dimethylformamid) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid) | Thermo Scientific (Rockford, USA) |
| EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat | AppliChem, Darmstadt |
| Essigsäure | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Ethanol, 99 % | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Goat, Anti-Mouse IgG (<i>whole molecule</i>), alkalische Phosphatase | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Harnstoff | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |

HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-
1,1,3,3-tetramethyl uranium)

| | |
|---|--|
| Hefeextrakt | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Isopropylthiogalactosid (IPTG) | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Kanamycin | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| KLH (Keyhole limpet hemocyanin) | Thermo Scientific, (Rockford, USA) |
| Magnesiumchlorid | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| Methanol | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| N,N-Dimethylformamid | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Temed) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Natriumperiodat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ni-NTA Magnetic Agarose Beads | Qiagen, Düsseldorf |
| Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| NHS (N-Hydroxysuccinimid) | Thermo Scientific (Rockford, USA) |
| Restriktionsenzym | Fermentas <i>Life Sciences</i> (Burlington, Kanada) |
| Salzsäure, mind. 37 %, rauchend | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| SDS ultra pure | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Streptavidin-coupled Dynabeads® | Invitrogen, USA |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas <i>Life Sciences</i> (Burlington, Kanada) |
| Taq-DNA-Polymerase, LC | Fermentas <i>Life Sciences</i> (Burlington, Kanada) |
| Tetracyclin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| TMB-one Solution | Promega, (Madison, USA) |
| Triethylamin | |
| TRIS | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |

Trypton/Pepton aus Casein,
pankreatisch verdaut

Schill + Seilacher chemische Spezialitäten,
Hamburg

2.9. GERÄTE UND SONSTIGE MATERIALIEN

American National Can., Chicago, USA

Parafilm "M" Laboratory Film

BD Falcon™, San Jose, U.S.A.

Vortex Genie 2

BioRad, München

Gene Pulser XCell und Pulse Controller,
Elektroporationsküvetten

Biozym, Hessisch Oldendorf

PCR-Tube ultradünn, 0,2 ml

Brand, Wertheim

PLASTIBRAND® UV-Küvetten

C. A. Greiner & Söhne, Nürtingen

Röhrchen 15 ml

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Mastercycler personal,
Centrifuge 5415 D,
Centrifuge 5415 R,
Bio Photometer,
Thermomixer compact

GE Healthcare Europe GmbH, München

Chelating Sepharose Fast Flow
(IMAC Säulenmaterial)
Elektrophoresis Power Supply EPS 301 und
601;

Gilson, USA

Mikroliter-Pipetten: Pipetman, 1000 µl, 200 µl
und 20 µl

Helma, Müllheim/Baden

Quarzküvetten (0,5 ml, 1 cm Schichtdicke)

Heraeus, Hanau

Multifuge 3L-R,
Multifuge 1.0,
Quarzglas-Bi-Destillationseinrichtung,
Typ Destamat E 18,
LaminAir HLB 2460 BS,
Kelvitron ® (Inkubator),
Brutschrank

Herolab, Wiesloch

UVT2035 302 nm (UV-Leuchttisch)

Hettich Andreas GmbH & Co. KG Tuttlingen

TZ Mikroliter 15 k rpm

Hoefer Scientific, San Francisco, USA

Platten für SDS-Gele,
SE 250 Gelkammer,

IKA-Labortechnik, Staufen

beheizbarer Magnetrührer IKAMAG RCT,
Schüttler VIBRAX-VXR,
KM02 Magnetrührer

Intas, Göttingen

Gel Jet Imager

| | |
|--|--|
| Kimberley-Clark, USA | Kimberley-Clark, USA |
| Leitz, Wetzlar | Diaver (Mikroskop) |
| M.D.H. Intermed GmbH | Sterilbank |
| Millipore, Eschborn | Filtereinheiten Millex FG13, Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage |
| Moulinex, Alençon (Frankreich) | Mikrowelle Microchef FM 3510 |
| Olaf Waase, Groß Schneen | Thermoblock V 4.0, Agarosegelkammer |
| Pharmacia Biotech, Freiburg | Autoklav HST 4-5-6 |
| Phenomenex, Torrance, U.S.A. | BioSep SEC-2000 |
| Roth, Karlsruhe | ZelluTrans, Rotiprotect Latex (Handschuhe), Serologische Pipetten, Visking® 20/32 (Dialysierschlauch) |
| SANYO E&E Europe BV, Biomedical Division, Loughborough (UK) | VIP Series -86 °C Freezer |
| Sarsted, Nürnberg | Safe Seal Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml, Röhrchen 50 ml, Petrischalen, Pipettenspitzen |
| Schleicher und Schuell, Dassel | Nitrozellulose-Membranen (0,45 µm), 3 MM Filterpapier (Whatman) |
| Schott, Mainz | Glaswaren |
| Scotsman Ice Systems, IL (USA) | AF 100 (Eismaschine) |
| Shimadzu Corporation, Kyoto (Japan) | UV 1650 PC UV-Visible Spectrophotometer |
| Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz | Kühlzentrifuge 3K30 mit Rotor 12158 H, Kühlzentrifuge 6K15 mit Rotor 12500, Feinwaage AX200 |
| Terumo, Leuven, Belgien | UNIHOOD (Inkubator) |
| UniEquip, Martinsried | Syringe Spritzen, 5 ml, 10 ml, 30 ml |
| Zeiss Winkel, Göttingen | Mikroskop |
| Zirbus, Bad Grund | Autoklav 2117-250 Novoblot (Western Blot Transfer Apparat) |

2.10. DATENVERARBEITUNGSPROGRAMME

| | |
|-------------------|-------------------------------|
| Microsoft, Office | Microsoft, Redmond, U.S.A. |
| Pymol | Schrödinger, New York, U.S.A. |
| Summit 4.0 | Beckman, Coulter |
| Bioedit | Tom Hall, CA 92008 |
| ChemDraw | Perkin Elmer |
| ChemSketch | ACD / Labs |

3. METHODEN

3.1. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

Vor dem Arbeiten mit mikrobiologischen Organismen wurden die verwendeten Geräte und Lösungen sterilisiert. Hitzestabile Geräte wurden für 20 min bei 181 °C erhitzt und hitzeunbeständige Geräte wurden mit 70 %igen (v/v) Ethanol gereinigt und getrocknet. Lösungen, Puffer und Medien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Lösungen und Lösungsbestandteile, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit Hilfe eines Membranfilters (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert.

3.1.1. ARBEITEN MIT *ESCHERICHIA COLI* STÄMMEN

Die Kultivierung und Vermehrung aller verwendeten *E. coli*-Stämme erfolgte, wenn nicht anders aufgeführt, in dYT-Medium bei 37 °C unter ständigem Schütteln. Zur Selektivität bei plasmidkodierender Resistenz wurden die entsprechenden Antibiotika dem Medium hinzugefügt. Kulturröhrchen wurden bei einem Volumen von bis zu 5 ml verwendet. Kulturen mit einem größeren Volumen wurden in Erlenmeyerkolben unter einer Thermohaube, oder einem Thermoschüttler bei 150- 180 rpm geschüttelt.

Die Zelldichte wurde über die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) im Spektralfotometer bestimmt. Als Leerwert diente ein entsprechendes Volumen an frischem Medium. Wurde eine OD₆₀₀ von über 1 gemessen, wurden die Zellen entsprechend verdünnt und die tatsächliche Zelldichte aus dem Verdünnungsfaktor errechnet.

Die dauerhafte Lagerung der in dieser Arbeit angefertigten Muteinbibliotheken erfolgte bei -80 °C mit 10 %DMSO (v/v). Alle anderen verwendeten *E. coli*-Kulturen wurden zur kurzfristigen Lagerung auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Lagerung der Kulturplatten erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C über einen Zeitraum von 2-3Wochen. Anschließend mussten die jeweiligen Zellen retransformiert werden.

3.1.2. ARBEITEN MIT *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Die Kultivierung und Vermehrung von *S. cerevisiae* erfolgte in YPD-Medium und bei plasmidvermitteltem auxotrophen Selektionsmarkern wurde SD-Medium verwendet. Die Zellen wurden bei 30 °C und 180 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Wie bei den *E. coli*-Zellen wurden Kulturröhrchen bei einem Volumen von bis zu 5 ml verwendet und Kulturen mit einem größeren Volumen wurden in Erlenmeyerkolben angezogen, wobei jedoch darauf geachtet wurde, dass das Kulturvolumen maximal 20 % (v/v) des Gesamtvolumens des Kolbens einnahm.

Analog zu den Bakterienzellen wurde auch bei den Hefezellen durch fotometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀) die Zelldichte bestimmt. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1 genau 10⁷ Hefezellen pro 1 ml.

Zur Induktion der plasmidvermittelten Proteinexpression wurden die zuvor kultivierten Zellen mittels Zentrifugation (4000 rpm, 3 min, RT) pelletiert und nach einem anschließenden Waschschrift mit PBS auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,5- 0,3 in SG-Medium überführt. Die Induktion im SG-Medium erfolgte über einen Zeitraum von zwei Tagen bei 20 °C im Thermoschüttler bei 180 rpm. In SG-PEG wurden die Zellen zwei Tage in Petrischalen ohne Schütteln bei 20 °C im Brutschrank induziert.

Die Lagerung der Hefe-Muteinbibliotheken und deren einzelne FACS-Runden erfolgte in *Yeast Freezing Solution*. Dafür wurden die zuvor in SD-Medium angezogenen Zellen durch drei minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in *Yeast Freezing Solution* resuspendiert und bei -80 °C weggefrohren.

3.1.3. ARBEITEN MIT PHAGEN

Für die Produktion von Phagen wurden *E. coli* ER2738 Zellen mit entsprechendem Phagemid in selektivem dYT-Medium inokuliert. ER2738 Zellen besitzen einen genomisch integrierten F-Pilus, welcher eine vom F-Plasmid codierte fadenförmige Ausstülpung ist, die für den Austausch von DNA unter den Bakterien (bzw. für den Zell-Zell-Kontakt) notwendig ist. Somit sind diese Zellen für eine Phageninfektion zugänglich. Bei Einzelklon Phagenproduktionen geschah die Inokulation in einem Volumen von 2 ml in Kulturröhrchen und bei der Produktion von Phagenbibliotheken wurden diese in 50 ml dYT-Medium in Erlenmeyerkolben kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden zur Superinfektion ca. 10¹³ Zellen des Helferphagen M13 vcs zugegeben. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 30 min. Da den infizierten *E. coli*-Zellen eine Kanamycin-Resistenz vermittelt wurde, wird vor der Induktion Kan und IPTG hinzugefügt. Die eigentliche Phagenproduktion erfolgte anschließend über Nacht bei 180 rpm und 28 °C im Thermoschüttler.

Im Folgenden wurden die *E. coli*-Zellen für 12 min bei 4000 rpm in einem 50 ml Falcon Röhrchen zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3L-R) und 35 ml des Überstands in ein neues 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Die im Überstand enthaltenen Phagen wurden mit 1/5 Volumen Phagenfällungspuffer versetzt und für vier Stunden auf Eis gefällt. Durch anschließende Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C (Sigma Kühlzentrifuge 3K30) konnte ein Phagenpellet gewonnen werden. Nach Trocknung des Phagenpellets konnte dieses in 1,6 ml PBS resuspendiert werden. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min, um die restlichen

Bakterienzellen von den Phagen zu trennen. Der Überstand wurde wieder mit 1/5 Volumen Phagenfällungspuffer versetzt für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde das trockene Phagenpellet in 0,5- 1 ml PBS aufgenommen und fotometrisch der Phagentiter bestimmt.

Der Phagentiter wurde durch Messung der Absorption bei 269 nm und 320 nm nach der folgenden Formel berechnet. Für die Messungen wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

$$\frac{\text{Phagenzahl}}{\text{ml}} = \frac{(A_{269} - A_{320}) * 6 * 10^{16}}{\text{Genomgröße}} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Lagerung der Phagen erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank über einen Zeitraum von vier bis acht Wochen.

3.1.4. TRANSFORMATION KOMPETENTER ORGANISMEN MITTELS ELEKTROPORATION

Zur Transformation der kompetenten Organismen wurde der Gene Pulser II (BioRad) verwendet. Die Transformation von *E. coli*-Zellen erfolgte stets nach der Methode von Dower *et al.* (Dower, 1988). *S. cerevisiae*-Zellen wurden nach Benatuil *et al.* (Benatuil, 2010) transformiert.

3.1.4.1. PRÄPARATION UND TRANSFORMATION VON ESCHERICHIA COLI

Für die Präparation elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden die entsprechenden Bakterienstämme von LB-Agarplatten inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 in dYT-Medium kultiviert. Das Ernten der Zellen erfolgte mittels Zentrifugation (Hereaus Multifuge 3L-R, 4000 rpm, 10 min, 4 °C). Die ständig auf Eis gehaltenen Zellen wurden anschließend in 30 ml eiskaltem, sterilem Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit 20 und 10 ml eiskaltem, sterilem Wasser wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgegossen und das Bakterienpellet in dem zurücklaufenden Restwasser resuspendiert. Bei der Retransformation von *E. coli*-Zellen wurden 1-3 µl des entsprechenden Plasmides mit 100 µl elektrokompenten Zellen in die Elektroporationsküvette überführt. Bei der Transformation der kompetenten Zellen mit einem Ligationsansatz wurden 5 µl dessen mit ebenfalls 100 µl Zellsuspension in die Küvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 200 mA Stromstärke, 2,5 kV Spannung, 6.250 V/cm Feldstärke, 5 s Impuls und Raumtemperatur. Optimale Bedingungen setzen eine Zeitkonstante von 4,5-5,0 ms voraus. Direkt im Anschluss an den Potenzialpuls wurde der Transformationsansatz in der Elektroporationsküvette mit 1 ml dYT-Medium gespült und der Inhalt in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gebracht. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C in einem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer compact). Zuletzt wurden die transformierten Zellen auf Selektionsplatten ausgestrichen.

3.1.4.2. PRÄPARATION UND TRANSFORMATION VON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Für die Herstellung elektrokompeter Hefezellen wurden EBY100-Kolonien in 50 ml YPD-Medium inokuliert. Diese wurden über Nacht bei 30 °C kultiviert und am folgenden Tag mit einer OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 1,6 wurden die Zellen durch Zentrifugation (Hereaus Multifuge 3L-R, 4000 rpm, 3 min, 4 °C) geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit 50 ml eiskaltem, sterilem Wasser erfolgte der letzte Waschschrift in eiskaltem, sterilem Puffer E. Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen auf Eis gehalten. Anschließend wurde das Zellpellet in 20 ml 0,1 M LiAcO/ 10 mM DTT resuspendiert und bei 30 °C für 30 min im Schüttler konditioniert. Die Zellen wurden danach mittels Zentrifugation pelletiert und erneut mit 50 ml eiskaltem, sterilem Puffer E gewaschen. Nach Abgießen des Überstands wurden die Zellen in einem Endvolumen von 1 ml aufgenommen. Pro Transformation wurden 400 µL kompetente Zellen in eine Elektroporationsküvette überführt und auf Eis gelagert. Für die Transformation der Zellen wurden jeweils 3-4 µg des geschnittenen Vektors und 10-12 µg des DNA-Inserts zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 1,5 kV, 25 µF, 200 Ω in einer 2 mm Küvette. Im Anschluss wurden die transformierten Hefezellen in 8 mL YPD/1 M Sorbitol gegeben und im 15 ml Falcon Röhrchen bei 30 °C für eine Stunde schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen pelletiert und in SD-Medium bei 30 °C für ein bis zwei Tage kultiviert. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurden Verdünnungen auf SD-Platten ausgestrichen.

3.1.5. MAGNETISCHE SORTIERUNG VON PHAGEN MIT IMMOBILISIERTEN SUIZIDSUBSTRAT

Um die Snoal-Muteinbibliothek auf der Phagenoberfläche nach Bindern des Aldolase-Suizidsubstrats zu durchmustern, wurde das biotinylierte Diketon (3.5.2.) auf der Oberfläche von Streptavidin-Dynabeads® immobilisiert. Dafür wurden 20 µl der magnetischen *beads* zunächst zweimal in einem Magnetständer mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden 10 µl des biotinylierten Suizidsubstrats in 90 µl PBS für eine Stunde mit den Streptavidin-beschichteten Magnetkügelchen schüttelnd bei RT inkubiert. Nach Inkubation wurde der Ansatz wieder in einen Magnetständer gestellt und der Überstand mit der Pipette entfernt. Nach zweimaligem Waschen der Magnet-*beads* wurden 100 µl der zu sortierenden Phagen hinzugegeben. Die Suspension wurde drei Stunden bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach folgten weitere Waschschriffe mit 200 µl PBS und anschließend wurden die Phagen von den *beads* eluiert. Von den eluierten Phagen wurden 10 µl für Verdünnungsplattierungen entnommen und der restliche Ansatz wurde zur Infektion einer 50 ml ER2738 Bakterien-Kultur zur Neuinfektion hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf selektiven Agar-Platten ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anhand der Verdünnungsplattierungen konnte der Phagentiter der eluierten Phagen bestimmt werden.

3.1.6. RETRO-ALDOLTEST MIT METHODOL

Zur Identifikation aktiver Aldolase-I Varianten wurde ein fluoreszenzbasierter Assay angewandt. In diesem Assay fungiert Methodol (Abbildung 3.1.1.) als Substrat für eine *Retro*-Aldolreaktion aktiver Aldolase-Varianten, das dabei entstehende fluorogene Produkt ist 6-Methoxy-2-naphthaldehyd (List, 1998). Dieser sog. Aldolsensor fluoresziert bei einer Wellenlänge von 452 nm, wenn er bei einer Wellenlänge von 330 nm angeregt wird.

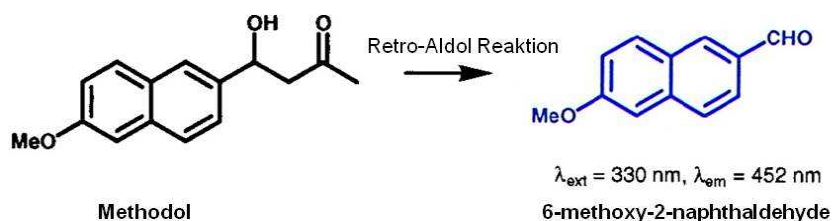


Abbildung 3.1.1.: Retro-Aldol Reaktion mit Methodol als fluorogenen Marker (modifiziert nach List, 1998).

Vor der Durchführung des *Retro*-Aldoltests wurden zunächst Einzelklone der Lysinvarianten (4.2.1.), oder der löslichen SnoaL-Muteinbibliothek (4.3.1.) von einer Kulturplatte in 1,5 ml dYT einer *deep-well* Platte überführt. Die Zellen wurden schütteln bei 37 °C inkubiert und bei leichter Trübung mit 0,2 % Arabinose induziert. Die Induktion in der *deep-well* Platte wurde über Nacht bei 30 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in der *deep-well* Platte zentrifugiert und das Pellet mit 80 μl BugBuster® durch 20 minütige Inkubation bei RT aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Plattenzentrifuge, 1 h, 3700 rpm) vom proteinreichen Überstand abgetrennt und dieser in eine Mikrotiter-Platte mit flachem Boden überführt. Zu den 80 μl des proteinreichen Überstands wurden 120 μl PBS mit 20 mM Imidazol und 10 μl Ni-NTA Magnet-beads gegeben. Nach Inkubation von einer Stunde schüttelnd bei RT wurde die Mikrotiter-Platte auf einen Magnetständer gestellt und der Überstand mit einer Pipette entfernt. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS-Tween (1 %). Anschließend wurden die über ein His-tag gebundenen Proteine mit 50 μl 500 mM Imidazol in PBS von den Nickel-beads eluiert. Der Elutionsschritt erfolgte nach einminütiger Inkubation auf dem Magnetständer. Der Überstand mit den gereinigten Proteinen wurde in eine schwarze Mikrotiter-Platte überführt. Für den *Retro*-Aldoltest wurden nun zu den 50 μl Überstand (ca. 10 μM gereinigtes Enzym) 50 μM Methodol (in 10 % DMSO) in 100 μl PBS hinzugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C wurden die Proben in der Mikrotiter-Platte im ELISA-Reader vermessen. Dazu wurde eine Anregungswellenlänge von 360 nm gewählt und die Emission bei 465 nm gemessen.

3.1.7. ELISA

Der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert (Engwall, 1971). Mit Hilfe des ELISAs wurde die Bindung der Muteinvarianten an das Suizidsubstrat überprüft.

3.1.7.1. PHAGE-ELISA MIT STREPTAVIDIN-BESCHICHTETEN MIKROTITERPLATTEN

Vor der Durchführung des *Phage-ELISAs* wurden zunächst ER2738 Einzelklone von verschiedenen Phagen-Screening Runden von Agarplatten ausgesucht und in *deep-well* Platten überführt. Die *deep-well* Platten wurden zuvor mit 1,5 ml dYT-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum befüllt. Die Phagen-Produktion in den *deep-well* Platten erfolgte wie unter 3.1.3. beschrieben nur in einem entsprechend geringerem Volumen. Nach der Phagen-Produktion wurden die *E. coli*-Zellen zentrifugiert und 100 µl des Überstands für den *Phage-ELISA* eingesetzt.

Die Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten wurden für eine Stunde mit jeweils 20 µl 1:10 verdünntem biotinylierten Suizidsubstrat inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe der produzierten Einzelklon-Phagen aus den 100 µl Kulturüberstand. Nach dreistündiger Inkubation der Phagen mit dem immobilisierten Diketon wurden die Mikrotiterplatten drei Mal mit PBS gewaschen. Für die Detektion gebundener Phagen wurden 10 µl eines anti-pVIII-Antikörpers (1:10000 in PBS) in 90 µl PBS in jedes well pipettiert. Dieser Ansatz wurde eine Stunde inkubiert und anschließend fünf Mal mit PBS gewaschen. Danach wurden 10 µl des Antikörpers anti-Maus Peroxidase-Konjugats (1:5000 verdünnt in PBS) zu 90 µl PBS pro well hinzugegeben. Die Entwicklung der Peroxidase-Reaktion erfolgte nach fünfmaligem Waschen mit PBS mit Hilfe von *TMB-one solution*. Dabei wurden pro well 90 µl der Lösung (1:1 verdünnt in Wasser) pipittiert. Nach sichtbarer Blaufärbung der einzelnen wells wurde die Reaktion mit 10 µl 100 mM Salzsäure abgestoppt. Die dabei entstehende Gelbfärbung konnte im *ELISA-Reader* bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden.

3.1.7.2. PHAGE-ELISA IN NUNC-MAXISORB-PLATTEN

Die Phagen-Produktion der Einzelklone erfolgte wie in 3.1.7.1. beschrieben. Es wurden ebenfalls 100 µl des Kulturüberstands mit den Phagen zum ELISA-Test eingesetzt. Diese 100 µl wurden in die *Nunc-Maxisorb*-Platten pipettiert und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Der Kulturüberstand wurde verworfen und die 96-well-Platte mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden 250 µl einer 3 %igen Milchpulverlösung in die Löcher der Mikrotiterplatte pipettiert und diese anschließend über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Nachdem die komplette Mikrotiterplatte 10 Mal mit PBS gewaschen wurden war erfolgte die Zugabe von 20 µl 1:10 verdünnten biotinylierten Suizidsubstrats. Nach dreistündiger Inkubation wurde die Platte erneut mit PBS gewaschen. Für die Detektion des gebundenen Suizidsubstrats an die Phagen wurden 10 µl eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats (1:1000 in PBS) in 90 µl PBS in jedes well pipettiert. Dieser Ansatz wurde eine Stunde inkubiert und anschließend fünf Mal mit PBS

gewaschen. Die Entwicklung der Peroxidase-Reaktion erfolgte analog zu 3.1.7.1. und konnte anschließend im ELISA-Reader bei 450 nm detektiert werden.

3.1.8. IMMUNFLUORESCENZ-MARKIERUNG VON *S. CEREVISIAE*

Die Immunfluoreszenz-Markierung des cMyc-Epitops diente als Induktionsnachweis. Es wurden ca. 10^7 vermeintlich induzierte Hefezellen zentrifugiert und das Pellet in 10 μ l unverdünnter anti-Myc-Antikörperlösung (AK Friedel) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgten ein Waschschriff mit 200 μ l PBS und eine erneute Zentrifugation der Hefezellen. Die Inkubation mit der zweiten Antikörperlösung (anti Maus-Biotin) dauerte ebenfalls 10 min auf Eis. Danach wurden die Zellen wieder mit 200 μ l PBS gewaschen und die pelletierten Zellen mit 10 μ l einer 1:10-Verdünnung von Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung resuspendiert und für 10 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Abschließend folgte ein weiterer Waschschriff und die Aufnahme des Zellpellets in 50-100 μ l PBS. Bis zur weiteren Analyse der Zellen am FACS wurden diese unter Lichtausschluss auf Eis gehalten.

3.1.9. MARKIERUNG DER *S. CEREVISIAE* SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEK MIT BIOTINYLIERTEN SUIZID-SUBSTRAT

Für eine Markierung mit dem biotinylierten Suizidsubstrat wurden jeweils ca. 10^9 induzierte Hefezellen eingesetzt (3.1.2.). Die Zellzahl wurde über die optische Dichte bei 600 nm bestimmt (3.1.2.) und ein entsprechendes Volumen an Zellkultur zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 200 μ l PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit 50 μ M biotinylierten Suizidsubstrat in einem Volumen von 500 μ l in PBS für 3 Stunden schwenkend bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand mit ungebundenen Substrat und freiem Biotin verworfen. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit wiederum 200 μ l PBS. Das Zellpellet wurde in 50 μ l einer 1:10 in PBS verdünnten Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung resuspendiert und für 10 min im Dunkeln auf Eis gehalten. Abschließend wurden die Zellen gewaschen und in einem Volumen von 200 μ l PBS bis zur Vermessung und Sortierung am FACS auf Eis gelagert.

3.1.10. SORTIERUNG DER *S. CEREVISIAE* SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEK AM FACS

Die fluoreszenzmarkierten Hefezellen wurden am FACS mit Sortiereinheit analysiert. Zuerst erfolgte die Kontrolle der Induktion anhand der Myc-Färbung (3.1.7.). Bei positiver Induktion folgte die Sortierung der SNOAL-Muteinbibliothek nach vermeintlichen Suizidsubstrat-Bindern. Vor jeder Messung am FACS wurde dieses mit fluoreszierenden *beads* (Polystyrenpartikel, Beckman Coulter) kalibriert. Es wurden folgende Einstellungen für eine Analyse oder Sortierung der Hefezellen am FACS vorgenommen: der FCS wurde auf 650, die rote Fluoreszenz (FL2) und die grüne Fluoreszenz (FL1) wurden auf 600 eingestellt. Die gesamten Messungen wurden mit

der Software Summit 4.0 bzw. CFlow® aufgezeichnet. Die ausgegebene Graphik zeigt auf der y-Achse die Ereignisanzahl und auf der x-Achse die relative Fluoreszenz.

Bei der Untersuchung von Einzelklonen wurde ein *Fluorescence Activated Cell Sampler* (Accuri) verwendet.

3.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1. EXTRAKTION UND FÄLLUNG VON DNA

Diese Methode dient der Reinigung und Konzentrierung der DNA.

Die Extraktion von DNA führt zu der Entfernung von Verunreinigungen, wie Proteinen, Ethidiumbromid oder Resten anderer hydrophober Kontaminationen. Als Extraktionsmittel wurden Phenol und Chloroform verwendet. Die durch die Lösungsmittel denaturierten Proteine sammeln sich in der hydrophoben Phenolphase an und können somit von der wässrigen DNA-Lösung getrennt werden. Es wurde ein Volumenanteil Phenol und zwei Volumenanteile Chloroform gegeben. Die Suspension wurde gut gevortext und anschließend wurden die zwei Phasen durch Zentrifugation (Hettich-Tischzentrifuge, 13.000 rpm, 3 min, RT) wieder hergestellt. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und wiederum mit einem Volumenanteil Chloroform durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase wieder abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Im Anschluss der Extraktion erfolgte für gewöhnlich die Fällung der DNA mit Hilfe von Ethanol und Ammoniumacetat. Diese Methode dient hauptsächlich der Konzentrierung von DNA. Mit Hilfe von Ethanol in Gegenwart monovalenter Kationen bildet die DNA einen unlöslichen Niederschlag und kann so von allen wässrigen Verunreinigungen getrennt werden. Zu der wässrigen DNA-Lösung wurden 1/10 Volumenanteil 7 M Ammoniumacetat-Lösung und drei Volumenanteile Ethanol (99 %) gegeben. Die Fällung der DNA erfolgte bei -20 °C für die Dauer von mindestens 30 min. Anschließend konnte die DNA durch Zentrifugation pelletiert werden (Eppendorf-Kühlzentrifuge *Centrifuge* 5415 R, 4 °C, 30 min). Zur Trocknung des Pellets wurde das Eppendorfgefäß offen für 10 min bei 37 °C auf einem Heizblock inkubiert. Anschließend konnte das Pellet im gewünschten Volumen an sterilem, bidestilliertem Wasser (H₂O bidest.) aufgenommen und gelöst werden.

3.2.2. ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA, wobei ein TAE gepuffertes System zum Einsatz kam (Downey, 2003). Die Agarose wurde in einer 1 %igen Lösung (w/v) in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. In die abgekühlte Agarose-Lösung

(ca. 60 °C) wurde zum Anfärben der DNA 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde in eine abgegrenzte Vertiefung (100 x 7 x 0,5 mm) einer Gellaufkammer gegossen und ein Taschenkamm eingesetzt. Die gesamte Gelkammer wurde nach Erstarren der Agarose mit TAE-Puffer übergossen. Die zu analysierenden oder aufzureinigenden DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumenanteil Sucrosefarbmarker versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung zwischen 100 und 120 V für 30-60 min (5 bis 10 V/cm Feldstärke). Als Längenstandard diente λ-DNA-Eco47I-Marker (100 ng/µl). Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden die Gele im UV-Durchlicht (324 nm) durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und fotografiert. Bei der präparativen Gelelektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Banden anschließend mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die weitere Aufreinigung der DNA erfolgte mit Hilfe und unter Anleitung des *Wizard SV Gel and PCR CleanUP Kits* (Promega).

3.2.3. ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PLASMID-DNA AUS *ESCHERICHIA COLI*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe und unter Anleitung des *PureYield™ Plasmid Miniprep System Kits* (Promega). Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte DNA bei -20 °C gelagert.

3.2.4. BESTIMMUNG VON DNA-KONZENTRATIONEN

Die DNA Konzentration wurde anhand fotometrischer Messungen und mit Hilfe des *Nano Drop* () bestimmt. Bei der Benutzung des Spektralfotometers (Shimadzu, UV-1650 PC) wurde in einer Mikroquarzküvette (Hellma, QS 1,000) die DNA in wässriger Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser gemessen. Dabei entspricht eine Absorption von 1,0 einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml. Um die Reinheit der Probe festzustellen kann zusätzlich eine Messung bei 280 nm durchgeführt werden. Bei proteinfreien DNA-Lösungen sollte das Verhältnis zwischen OD₂₆₀/OD₂₈₀ bei ungefähr 2:1 liegen.

3.2.5. RESTRIKTION UND LIGATION VON PLASMID-DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte nach den jeweiligen vom Hersteller der Endonukleasen empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen. Ein Doppelverdau mit zwei Enzymen wurde ebenfalls nach Herstellerempfehlungen durchgeführt, wobei es zu beachten galt, dass die jeweiligen Restriktionsenzyme mindestens 50-100 % Aktivität besaßen. Üblicherweise wurden 100 ng/µl DNA mit 1-2 *Units* Enzym pro µg DNA für mindestens eine Stunde bei empfohlener Temperatur inkubiert. Um die gespaltenen DNA-Fragmente anschließend wieder ligieren zu können, wurden die Restriktionsansätze mit Hilfe des *Wizard SV Gel and PCR CleanUP Kits* (Promega) aufgereinigt.

Für die Ligation wurde ein vierfacher molarer Überschuss an DNA-Insert-Fragment gegenüber DNA-Vektor-Fragment eingesetzt. Es wurden 2-4 *Units* T4-DNA-Ligase (Fermentas) mit dazugehörigem Puffer zu den DNA-Fragmenten gegeben und der Ansatz auf 20 µl mit Wasser (H₂O bidest.) aufgefüllt. Die Ligation wurde je nach Zeitdruck über Nacht bei 12 °C im Kühlschrank, 30-60 min bei 37 °C oder 10 min bei RT durchgeführt. Anschließend wurden 3-5 µl des unaufgereinigten Ligationsansatzes für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet.

3.2.6. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die *in vitro* Methode der *polymerase chain reaction* (PCR) ermöglicht die enzymatische Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Mullis, 1987; Saiki, 1985; Saiki, 1988). Durch Denaturierung wird im ersten Schritt die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. Aufgrund von Temperaturerniedrigung wird ein anschließendes Anlagern der Oligonukleotid-*Primer* an das DNA-*Template* möglich gemacht. Im letzten Schritt der PCR verlängert die thermostabile Polymerase die *Primer* komplementär zur ursprünglichen dsDNA. Die Amplifikation der DNA erfolgt über mehrere Zyklen, wobei die von den *Primern* flankierte Region (PCR-Produkt) exponentiell vervielfältigt wird.

Für die PCR wurden 5-20 ng DNA als Template eingesetzt. Desweiteren wurden 5 µl Taq-Puffer (10x), 5 µl MgCl₂ (70 mM), 1 µl dNTPs (10 mM), die jeweiligen Oligonukleotide (1 µl, 10 M) und die Taq-Polymerase (1 *Unit*) für den Ansatz benötigt und dieser mit Wasser (H₂O bidest.) auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Um zu Beginn der 30 Zyklen der PCR eine vollständige Denaturierung des *Templates* zu gewährleisten wurde eine sog. *Hot Start*-PCR durchgeführt, bei der am Anfang für die Dauer von 2 min der gesamte Ansatz bei 98 °C aufgeköcht wird (Tailor, 1997). Die weiteren Reaktionsschritte wurden an die Länge der zu amplifizierenden DNA-Fragmente und deren Basen-Zusammensetzung angepasst. Die anschließende zyklische Denaturierungsphase verlief bei 95 °C für die Dauer von 30 s. Für die Hybridisierung der wurde meistens eine Temperatur von 52 °C gewählt, wobei die optimale Schmelztemperatur der Oligonukleotide auf deren Lieferschein dokumentiert war. Das *Primer-Annealing* dauerte in der Regel ebenfalls 30 s. Der Elongationsschritt wurde stets bei 72 °C durchgeführt und die entsprechende Elongationszeit so gewählt, dass sie 60 s pro 1000 bp betrug. Am Ende jeder PCR erfolgte eine Endelongation bei 72 °C für 4 min.

Eine Variante der PCR, die SOE-PCR (*splicing by overlap extension*) (Horton, 1989), kam bei der Generierung der Lysinvarianten und Muteinbibliotheken zum Einsatz. Bei dieser besonderen PCR Methode werden zuerst unabhängig voneinander zwei einzelne PCR-Produkte generiert. Diese besitzen jeweils einen Basenpaar-Bereich, welcher komplementär zu dem jeweils anderen PCR-Produkts ist. Die einzelnen PCR-Produkte können so in einer weiteren PCR zu einem vollständigen DNA-Fragment zusammen gesetzt werden. Während der *Annealing*-Phase lagern

sich dabei die beiden zuvor generierten PCR-Produkte aufgrund der komplementären Basenpaare aneinander. Erst nach zehn Zyklen der PCR-Produkt Hybridisierung werden die *Primer* für den flankierenden Außenbereich des neuen PCR-Produktes zu der Reaktion dazugegeben und die PCR für weitere 20 Zyklen fortgesetzt. Mit dieser Methode können gezielt Punktmutationen in ein Gen eingebracht werden.

Im Anschluss an eine PCR wurde das Produkt mit Hilfe des *Wizard SV Gel and PCR CleanUP Kits* (Promega) aufgereinigt. Für die PCR wurde meistens der *Mastercycler personal* (Eppendorf) verwendet.

3.2.7. SUCROSE-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION

Diese Methode wurde zur Aufreinigung gespaltener Plasmide verwendet, welche zur Generierung einer Bibliothek eingesetzt wurden. Das zuvor enzymatisch verdaute Plasmid wird über eine Dichte-Gradientenzentrifugation nach Sedimentationskoeffizient in einem Schwenkbecherrotor der Dichte nach separiert. Als Trennungsmatrix dient hierbei eine Sucroslösung. Mit Hilfe eines Gradientenmischers werden Ultrazentrifugationsröhrchen mit den verschiedenen Zuckerkonzentrationen (10 %, 30 % und 40 % (w/v)) befüllt, wobei die 40 %ige Sucroslösung in das Röhrchen vorgelegt wird. Der fertige Gradient wird vorsichtig mit der Probe und Parafinöl beschichtet und für 21 Stunden bei 30.000 rpm im Vakuum zentrifugiert (Beckman-Optima™ LE- 80K Ultrazentrifuge, SW41TI-Schwenkbecherrotor). Direkt im Anschluss an die Zentrifugation wird das Zentrifugenröhrchen mit einer Kanüle am Boden aufgestochen und Fraktionen a 500 µl gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf einem Agarosegel analysiert und die Fraktionen mit dem gewünschten Vektorfragment wurden vereinigt. Das so gereinigte Vektorfragment wurde anschließend mit Ethanol und Ammoniumacetat gefällt und bei -20 °C gelagert.

3.3. PROTEINCHEMISCHE METHODEN

3.3.1. PRODUKTION VON PROTEINEN

Die Expression der löslichen Proteinvarianten von SnoaL, AknH und Aristolochene- und Pentalenene Synthase erfolgte im *E. coli* Stamm Top10 in dem jeweiligen pBAD-Vektorkonstrukt. Für die jeweiligen Produktionen wurden jeweils drei Einzelklone von einer Kulturplatte in 50 ml dYT-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 3- 5 ml dieser Übernachtskultur in einen neuen 50 ml dYT-Kolben inokuliert und weiter bei 37 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 in 1 l dYT-Medium überführt und bei gleicher Temperatur und 180 rpm inkubiert. Die Expression im 1 l Maßstab wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 durch Zugabe von 0,2 % L-Arabinose gestartet und dabei die Temperatur auf 30 °C gesenkt. Die Induktion erfolgte über Nacht. Am nächsten Morgen wurden

die Zellen bei 4 °C für 20 min zentrifugiert (Sigma 6K15, Rotor 12500). Das Zellpellet wurde in insgesamt 20-25 ml PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C in einem Falcon-Gefäß gelagert.

3.3.2. ZELLAUFSCHLUSS VON *ESCHERICHIA COLI*

Zum Aufschluss der *E. coli* Zellen wurde ein Ultraschall-Gerät (*Sonoplus Homogenisator* (Bandelin)) verwendet. Die Bakterienzellen werden durch starke und schnelle Druckänderungen aufgebrochen. Die Sonifikation erfolgte bei 70 % Leistung für 2 min auf Eis. Dieser Vorgang wurde 3-4-mal wiederholt, wobei vor jedem Schritt mindestens 5 min gewartet wurde, bis die Zellsuspension wieder abgekühlt war. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 14000 rpm zentrifugiert (Sigma 3K30) und die im Überstand enthaltenen Proteine zur weiteren Aufreinigung auf eine IMAC Säule gegeben.

3.3.3. BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN

Die Proteinkonzentrationen wurden fotometrisch bei 280 nm bestimmt. Die dazu notwendigen Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Proteine wurden zuvor berechnet.

3.3.4. ANALYTISCHE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Zur Analyse wurden die Proteine auf eine diskontinuierliche denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen (Laemmli, 1970; Schägger, 1987; Schägger, 2006). Die Gele wurden in einer Gelgießkammer (Hoefer *Scientific* SE 250) zu 5-10 Stück gegossen. In Tabelle 3.3.1. ist die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele angeführt.

Tab. 3.3.1.: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel nach Schägger und Kollegen (Schägger, 2006). Angaben für 10 Gele.

| Lösung | Trenngel | Sammelgel |
|--|----------|-----------|
| 30 % (w/v) Acrylamid/0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel 30) | 40 ml | 3,2 ml |
| 3M Tris/HCl pH 8,45, 0,3 % SDS | 20 ml | 6,2 ml |
| H2O bidest. | - | 15,2 ml |
| 10% Ammoniumperoxodisulfat(aq.) | 200 µl | 200 µl |
| TEMED | 30 µl | 30 µl |

Nach dem Auspolymerisieren der Gele, konnten diese in die Gellaufkammer eingesetzt und mit dem Kathodenpuffer überschichtet werden. Der Taschenkamm wurde entfernt und der Anodenpuffer in die entsprechende Kammer gefüllt. Nachdem die zu analysierenden Proben mit 1/5 Volumen HOECHST-Puffer versetzt und für 10 min bei 99 °C erhitzt wurden, konnten sie aufgetragen werden. Als Größenvergleich wurde, wenn nicht anders beschrieben, der *Unstained Molecular Weight Marker* (Fermentas GmbH) mitgeführt. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 35 mA eingestellt. Die Spannung wurde auf maximale Voltzahl eingestellt. Anschließend wurden

die Gele mit *Coomassie* Brilliantblau R-250 gefärbt, welches unspezifisch an basische Seitenketten von Proteinen bindet (Schägger, 1987; Meyer, 1965). Entfärbt wurden die Gele, indem sie mit Wasser in der Mikrowelle mehrmals aufgekocht wurden.

3.3.5. WESTERN-BLOT ANALYSE

Diese Analysemethode wurde zur genauen Spezifizierung und Detektion von Proteinen eingesetzt (Blake, 1984; Renard, 1979; Swanson, 1982; Towbin, 1979). Die Proteine werden aus einem SDS-Polyacrylamidgel per Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit geeigneten Antikörpern kenntlich gemacht. Die Detektion erfolgt mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase gekoppelten Immunfärbung. Bei dem verwendeten *semidry blot* Verfahren wurde das verwendete Gel, Whatmanpapier und eine Nitrozellulosemembran zunächst mit WB-Transferpuffer getränkt und anschließend auf die Transferapparatur gebracht (NOVOBLOT-Apparatur). Die Nitrozellulosemembran und das Gel wurden, dabei von jeweils vier Whatmanpapieren umgeben, zwischen die Graphitioden gelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanten 15 V und maximaler Stromstärke. Danach wurde die Membran über Nacht mit 3 % Milchpulver in PBS im Kühlschrank inkubiert. Nachdem die Membran anschließend 3 mal mit PBS-Tween gewaschen wurde, konnte diese mit dem primären Antikörper in 1,5 % Milchpulver in PBS für mindesten eine Stunde bei RT schwenkend inkubiert werden. Vor und nach der einstündigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Zellulosemembran wiederholt mit PBS-Tween gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte jedoch stets mit Wasser, da der sekundäre Antikörper mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Die Nachweisreaktion wurde in AP-Puffer durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Zugabe der Reagenzien 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT). Dabei wird BCIP durch die alkalische Phosphatase und anschließender Oxidation zu einem Indigofarbstoff umgesetzt. NBT wird dadurch zu einem blauen Farbstoff reduziert wobei die Sensitivität der Detektion verstärkt wird. Anschließend konnte die Nitrozellulosemembran eingescannt werden.

3.4. CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN

3.4.1. IMAC

Die *Immobilized Metalion Affinity Chromatography* (IMAC) basiert auf der Eigenschaft, dass metallchelatierende Gruppen multivalente Übergangsmetallionen binden (Porath, 1975, Porath, 1983). Dies macht es möglich, Proteine mit einem Polyhistidin-*tag* aus *E. coli*-Zellextrakten aufzureinigen. Als Matrix für die Säulenchromatografie wurde *Chelating Sepharose™ Fast Flow* (GE Healthcare) verwendet. Nach Angaben des Herstellers wurde die Chromatographiesäule mit einem Volumen von 2 ml gepackt und zunächst mit 5 SV 100 mM NiCl₂ beladen. Ni²⁺ fungiert hierbei als immobilisiertes Metallion. Anschließend wurde die Säule mit 5 SV Wasser gewaschen und dann mit 5 SV PBS äquilibriert. Der gesamte Zellaufschluss wurde auf die

Chromatographiesäule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Es folgte ein Waschschrift mit 5 SV PBS. Anschließend wurde stufenweise mit steigenden Imidazolkonzentrationen (20, 40, 60, 80, 100, 200, 500 mM Imidazol in PBS) mit je 5 SV eluiert und der Durchfluss in Falcon-Röhrchen gesammelt. Abschließend wurde die Säule mit 5 SV 100 mM EDTA regeneriert und im Kühlschrank bei 4 °C bis zum weiteren Gebrauch in 20 % Ethanol gelagert. Die gesammelten Fraktionen wurden ebenfalls im Kühlschrank gelagert, oder direkt auf ein Polyacrylamidgel (3.3.4.) aufgetragen. Nach Analyse der einzelnen Fraktionen wurden diese mit dem gewünschten Protein zusammengeführt und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gegen 2 l PBS dialysiert. Am nächsten Tag wurde der Dialysepuffer erneuert und die Probe für weitere 2-3 Stunden einer Dialyse unterzogen.

3.4.2. HPLC

Die Methode der *Reversed-phase High Pressure Liquid Chromatography* (RP-HPLC) wurde zur Aufreinigung der biotinylierten Substrate eingesetzt. Die RP-HPLC ermöglicht die Trennung von Substanzen mit unterschiedlicher Hydrophobizität auf der Grundlage der Interaktion des Probenmaterials mit der Säulenmatrix. Ein Konzentrationsgradient aus Lösungsmittel und Wasser wird für die Elution der Substanzen verwendet. Als Trägermaterial dient ein an Kieselgel gekoppelter Alkylrest mit einer Länge von C2-C18, hydrophobe Substanzen werden somit erst bei hohen Konzentrationen an organischem Lösungsmittel von der Säule gelöst. Für die Aufreinigung der biotinylierten Substrate wurden C18-Säulen verwendet (Synergi 4u Hydro-RP 80 A; 250 x 4.60 mm (Phenomenex)). Es wurden Gradienten von 10-80 % und 10-60 % verwendet, Eluent B (Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA) gegen Eluent A (Aqua bidest, 0,1 % (v/v) TFA) in einem Zeitraum von 35 min bei einer Flussrate von 1 ml/min. Alle Einstellungen wurden mit der analytischen (HPLC Varian 920-LC Analytical HPLC) und präparativen HPLC (PrepStar 218 Solvent Delivery Module, ProStar 410 HPLC AutoSampler und ProStar 325 Dual Wavelength UV-Vis HPLC Detector) systemgesteuert. Das Sammeln der Proben erfolgte per Hand bei einem Ausschlag des Detektors bei 220 nm. Anschließend wurden die Massen der gesammelten Proben in der LC/MS bestimmt.

3.5. CHEMISCHE METHODEN

3.5.1. SYNTHESE DER SUIZIDSUBSTRATE

Die Diketon-Varianten für das *Screening* der aktiven Lysinvarianten wurden von Deniz Güclü aus dem Arbeitskreis von Prof. Fessner (TU-Darmstadt) synthetisiert und für die Biotinylierung bereitgestellt (Abbildung 3.5.1.).

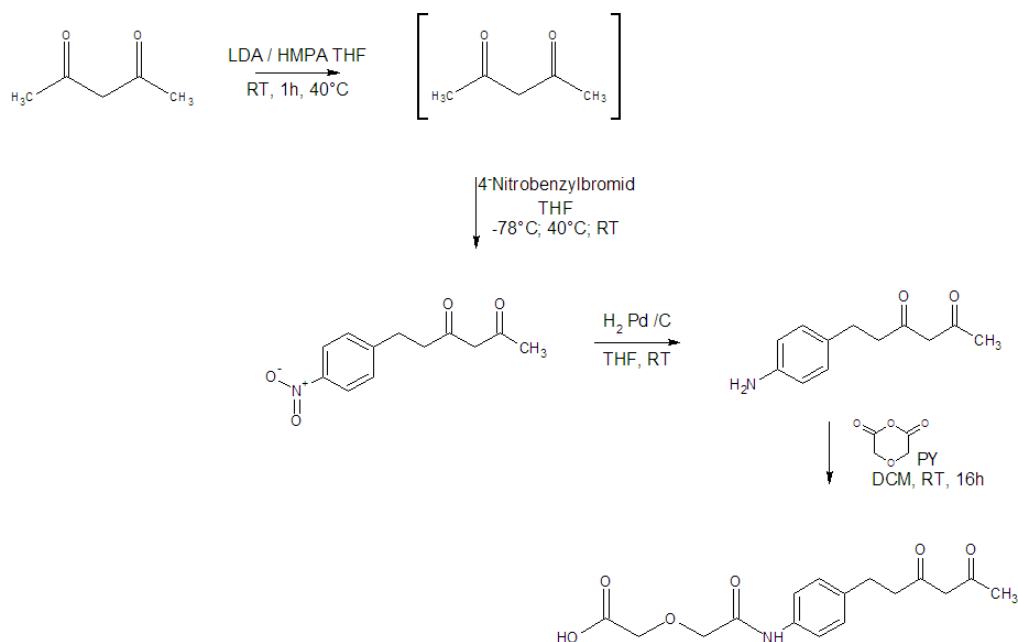


Abbildung 3.5.1.: Synthese eines linearen Lysin-Markers: 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dion und einer COOH-Linkervariante (nach Reymond, 2006).

3.5.2. BIOTINYLIERUNG DER SUIZIDSUBSTRATE

Für die Biotinylierung des 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dions (NH_2 -Diketon) wurden zunächst 8 mg (MW=191 g/mol; 42 μmol) in 800 μl DMF gelöst und 8 μl Triethylamin hinzugegeben (Abbildung 3.5.2.). Parallel dazu wurden 1,5eq (35 mg) Sulfo-NHS-LC-Biotin (MW=556,59 g/mol; 63 μmol) in 1,2 ml DMF gelöst. Anschließend wurden die beiden Lösungen zusammengefügt und für drei Stunden schwenkend bei RT inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Ethanol (99 %) gestoppt. Das Produkt wurde anschließend in der HPLC und LC-MS überprüft.

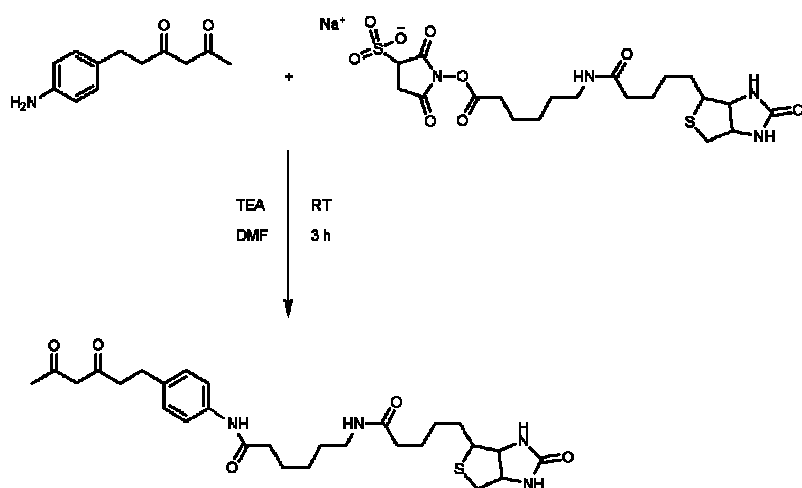


Abbildung 3.5.2.: Biotinylierung des 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dions (NH_2 -Diketon).

Die Säuregruppe der COOH-Linkervariante musste vor der Biotinylierung zunächst aktiviert werden. Dazu wurden 2 eq (57 mg) des Diketon-Derivats (MW=320 g/mol; 178 μmol) mit

0,95 eq HBTU (34 mg; 89,6 μmol =1eq) und 4 eq DIEA (15 μl ; 88 μmol =1eq) in 1 ml DMF gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei RT wurden 0,5 eq (17 mg) Amine-PEG₂-Biotin (MW=374,5 g/mol), die zuvor in 150 μl DMF gelöst worden waren hinzugefügt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und am darauf folgenden Tag mittels HPLC und LC-MS analysiert. Anschließend wurde das Produkt über die präparative HPLC gereinigt und die einzelnen gesammelten *peaks* erneut analysiert.

3.5.3. KUPPLUNG DES SUIZIDSUBSTRATS AN ANTIGENE

Um eine Immunantwort gegen das Diketon-Hapten auszulösen wurde die stabilere Linkervariante (das Carboxyl-Derivat) an das Trägerprotein KLH gekuppelt. Die Kupplung erfolgte an freie Aminogruppen über 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC). Die Durchführung der Konjugation erfolgte in MES-Buffer (pH 6,1). Zunächst wurden 2 mg des Diketon-Derivats in 20 μl DMF gelöst. Das Trägerprotein KLH wurde in einem 31 mM Natriumphosphatpuffer mit einer Konzentration von 10 mg/ml geliefert. Davon wurden ebenfalls 20 μl in den Reaktionsansatz gegeben. Desweiteren wurden 20 μl einer 1:1 Mischung von EDC und NHS (10 mg/ml) in insgesamt 1 ml 100 mM MES-Puffer (pH 6,1) hinzugefügt. Da nach Zugabe des Diketon-Derivats in den MES-Puffer sich eine milchig gelbe Lösung bildete wurden noch 160 μl DMF dem Reaktionsansatz beigelegt, bis das Diketon wieder in Lösung ging. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurde das Reaktionsprodukt über eine PD10-Säule gereinigt.

4. ERGEBNISSE

4.1. SUCHE NACH GEEIGNETEN PROTEIN-*SCAFFOLDS* FÜR DIE ZYKLISIERUNG EINES LINEAREN DIKETONS

Auf der Suche nach einem neuen Zugang zu einer biotechnischen Produktion von makrozyklischen Moschusriechstoffen, sollten Proteingerüste gefunden werden, welche in der Lage sind, die Zyklisierung eines langkettigen linearen Diketons über eine Aldoladdition zu katalysieren.

4.1.1. AUSWAHL EINES GEEIGNETEN PROTEIN-*SCAFFOLDS*

Geeignete Proteingerüste wurden nach folgenden Kriterien identifiziert: (a) Das Protein muss einer bekannten Kristallstruktur und einem bereits vorhandenen Zyklisierungsmechanismus der Enzymkandidaten entsprechen (1.3.). (b) Es sollten die ausgewählten Proteingerüste über ein weitgehend hydrophobes aktives Zentrum der benötigten Dimension verfügen, um ein lineares Kohlenstoffgerüst der Länge von C16 als Substrat zu akzeptieren. Die Auswahl fiel daher nach Durchmusterung der Proteinstrukturdatenbanken auf die Polyketid Cyclasen SnoaL und AknH und die Terpen-Synthasen Pentalenene- und Aristolochene-Synthase (1.3.).

Nach der Auswahl der potenziellen Proteingerüste als Startpunkt für eine evolutive Optimierung wurde zunächst überprüft, ob und wie die verschiedenen Enzym-Kandidaten sich in *E. coli* produzieren lassen. Die Polyketid-Cyclasen SnoaL und AknH wurden in einem Expressions-Plasmid von Prof. Dr. G. Schneider (Karolinska Institut, Schweden) zur Verfügung gestellt (Sultana, 2004; Kallio, 2006). Von den Sesquiterpen-Synthasen (Aristolochene und Pentalenene Synthase) wurden für *E. coli* codonoptimierte vollsynthetische Gene von einem kommerziellen Anbieter erhalten.

4.1.2. KLONIERUNG GEEIGNETER PROTEIN-*SCAFFOLDS*

Die Polyketid-Cyclasen SnoaL und AknH wurden in dem Expressionsplasmid pBAD produziert (Sultana, 2004; Kallio, 2006). Dieser Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz und einen Arabinose-Promoter (2.2.). Zur Aufreinigung der Proteine befindet sich auf dem Plasmid ein N-terminales His-tag. Die 540 bp großen Gene der Polyketid-Cyclasen wurden über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Hind*III in den pBAD-Vektor eingebracht. Die synthetischen Gene der Sesquiterpen-Synthasen wurden zur Produktion auch in den pBAD-Vektor kloniert. Da diese jedoch mit *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen bestellt wurden, mussten zunächst *Sfi*I-Schnittstellen in das Expressionsplasmid eingebracht werden. Dies erfolgte durch Einsetzen des BMP-VHH-*Sfi*I-Gens über *Bgl*II und *Hind*III, welches zuvor mit eigens dafür generierten *Primern*

mittels PCR amplifiziert wurde (Abbildung 4.1.1.). Alle Klonierungen wurden mittels Testrestriktion und anschließender Sequenzierung auf die richtige Basenabfolge hin überprüft.

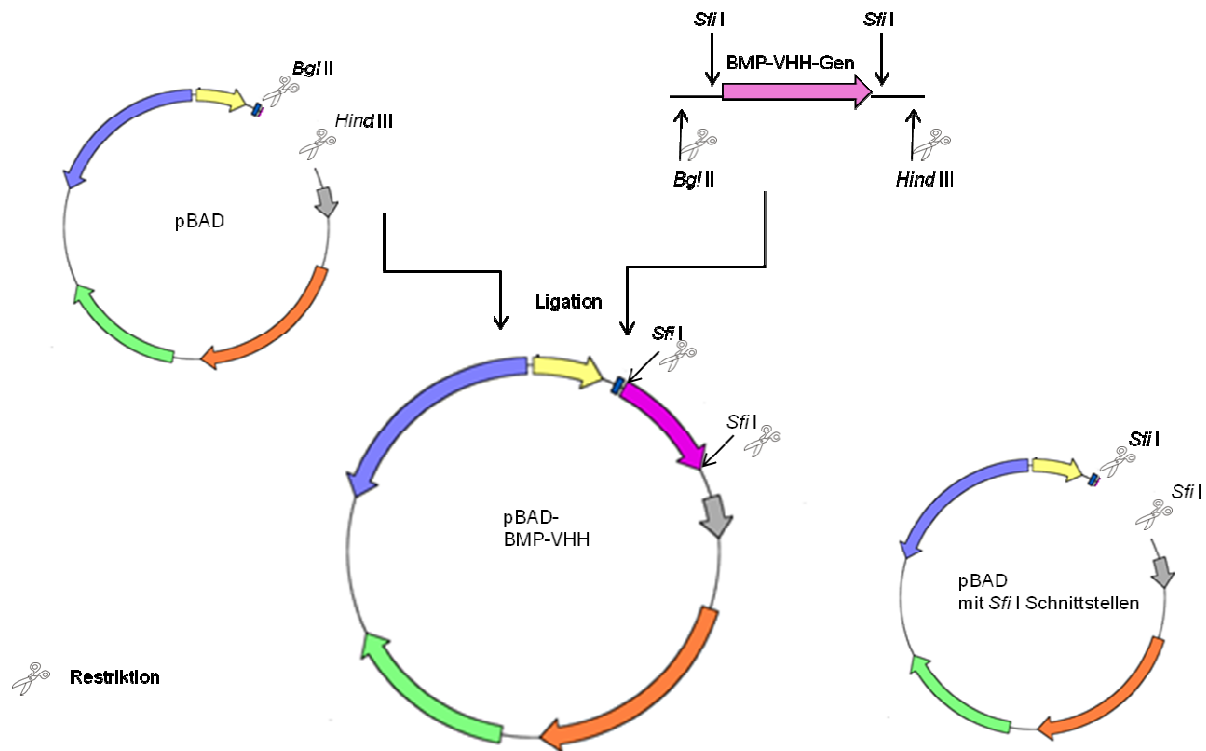


Abbildung 4.1.1.: Klonierungsschema für pBAD-Vektor mit *SfiI*-Schnittstellen.

4.1.3. UNTERSUCHUNGEN ZUR REKOMBINANTEN EXPRESSION DER PROTEIN-SCAFFOLDS

Die Produktion der Polyketid-Cyclasen erfolgte in 1 l dYT-Medium. Die mit dem Plasmid transformierten TOP10 Zellen wurden bei 37° C angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 0,2 % Arabinose induziert (3.3.1.). Die Proteine wurden bei 30° C über Nacht produziert (Kallio, 2006). Die anschließende Aufreinigung erfolgte nach Sonifizieren (3.3.2.) mittels IMAC (3.4.1.). Die Dialyse der proteinreichen Fraktionen (60-500 mM Imidazol) geschah in 2 l PBS über Nacht bei 4° C. Abbildung 4.1.2. A zeigt die einzelnen Isolierungsschritte vom Rohextrakt der Expression des SnoaL-Wildtyps (Spur 1) bis zum isolierten Protein (Spur 7-9).

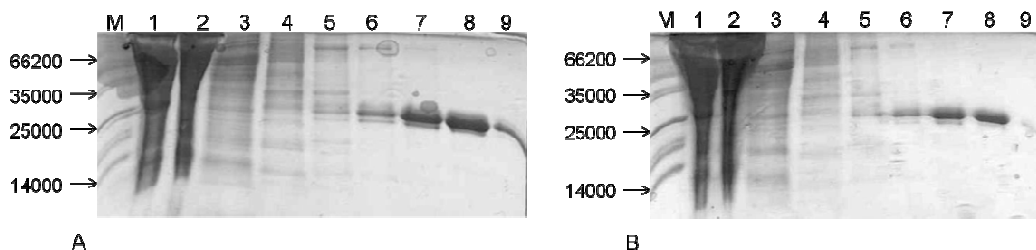


Abbildung 4.1.2.: SDS-Gel der IMAC-Aufreinigung der Polyketidsynthasen; A: SnoaL; B: AknH. M = Fermentas® *Molecular Weight Marker*. 1: Rohextrakt, 2: Durchfuss, 3: Waschschrift, 4: 20 mM Imidazol, 5: 40 mM Imidazol, 6: 60 mM Imidazol, 7: 100 mM Imidazol, 8: 200 mM Imidazol, 9: 500 mM Imidazol.

In Spur 7-9 in Abbildung 4.1.2. A ist unterhalb der Markerbande von 25000 eine Bande zu erkennen, welche der Größe von SnoaL entspricht (MW: 20712). Ebenso verhält es sich in Abbildung 4.1.2. B, in der die einzelnen Isolierungsschritte der Polyketid-Cyclase AknH auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. In Spur 7-9 ist knapp unter der Markerbande von 25000 eine Bande in der entsprechenden Größe von AknH (MW: 20511) zu erkennen. Die einzelnen Fraktionen von 60-500 mM Imidazol wurden vereinigt und nach der Dialyse wurde die Gesamtproteinausbeute fotometrisch bestimmt (3.3.3.). Für den SnoaL-Wildtyp betrug die Proteinausbeute aus einem Liter Zellkultur 10,7 mg. Von dem AknH-Wildtyp konnte eine Proteinmenge von 8,8 mg aus einem Liter Zellkultur aufgereinigt werden.

Die Expression der Pentalenene Synthase erfolgte analog zu den Polyketid-Cyclasen. Die einzelnen Fraktionen der Isolierung wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Abbildung 4.1.3.).

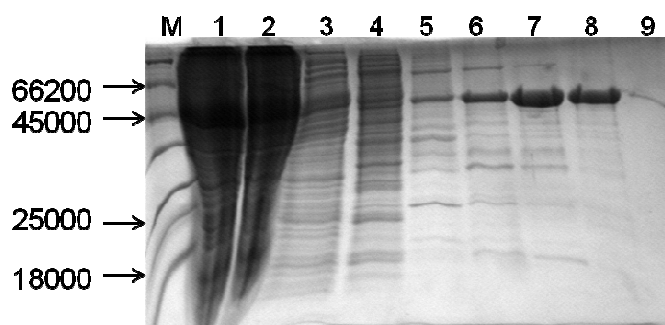


Abbildung 4.1.3.: SDS-Gel der IMAC-Aufreinigung der Pentalenene Synthase. M : Fermentas® *Molecular Weight Marker*. 1: Rohextrakt, 2: Durchfuss, 3: Waschschrift, 4: 20 mM Imidazol, 5: 40 mM Imidazol, 6: 60 mM Imidazol, 7: 100 mM Imidazol, 8: 200 mM Imidazol, 9: 500 mM Imidazol.

Bei den Elutionsfraktionen in Spur 6-9 (Abbildung 4.1.3.) ist eine Bande unterhalb der Markerbande von 45000 zu erkennen. Dies entspricht in etwa der Größe der Pentalenene Synthase (MW: 38110,69). Um die Menge an gereinigtem Protein zu bestimmen, wurden die proteinhaltigen Fraktionen (60-500 mM Imidazol) gegen PBS dialysiert. Eine fotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration (3.3.3.) ergab eine Ausbeute von 10,4 mg aus 1 l Zellkultur.

Die Expression der Aristolochene Synthase war auch nach wiederholten Malen nicht erfolgreich. Da die Aristolochene Synthase auch in anderen Vektoren nicht exprimiert werden konnte (siehe Tabelle 4.1.1.), wurde sie als ein weiteres Protein-*Scaffold* zur Zyklisierung eines linearen Diketons ausgeschlossen. In Tabelle 4.1.1. sind die getesteten Vektoren und Proteinausbeuten zusammengefasst.

Tabelle 4.1.1.: Zusammenfassung der produzierten Proteine mit den jeweiligen Ausbeuten aus 1 l Zellkultur.

| Protein | Vektor | Ausbeute aus 1 l Zellkultur |
|------------------------|--------|-----------------------------|
| SnoaL | pBAD | 10,7 mg |
| AknH | pBAD | 8,8 mg |
| Pentalenene Synthase | pBAD | 10,4 mg |
| Pentalenene Synthase | pET11a | - |
| Aristolochene Synthase | pBAD | - |
| Aristolochene Synthase | pET11a | - |

4.2. KONSTRUKTION POTENZIELLER KLASSE I ALDOLASE-SCAFFOLDS DURCH ORTSGERICHTETE INSTALLATION VON LYSINRESTEN

Durch Kombination von gelenkter Evolution und rationalem *Design* sollen an ausgewählten Aminosäurepositionen in unmittelbarer Substratnähe Lysinreste eingeführt werden. Die eingebauten Lysinreste müssen in der Lage sein, den Mechanismus einer Klasse I Aldolase nachzustellen. Damit der Lysinrest eine Schiff'sche Base bilden kann, muss dieser als Nukleophil reagieren können. Dazu wäre ein pH-Wert über dem isoelektrischen Punkt von 9,82 erforderlich. Da aber die Zyklisierungsreaktion bei einem physiologischen pH-Wert stattfinden sollte, müssen die Aminosäuren in der näheren Umgebung die Aktivierung des Lysinrests durch Erniedrigung des pK-Werts bewirken.

Mittels Suizid-Substrat sollen zunächst Mechanismus-orientierte Enzymvarianten isoliert werden. Für den Abfang Schiffbasen-aktiver Lysinreste eignen sich insbesondere 2,4-Diketone, da die Kondensate irreversibel gebildet werden (Abbildung 4.2.1.).

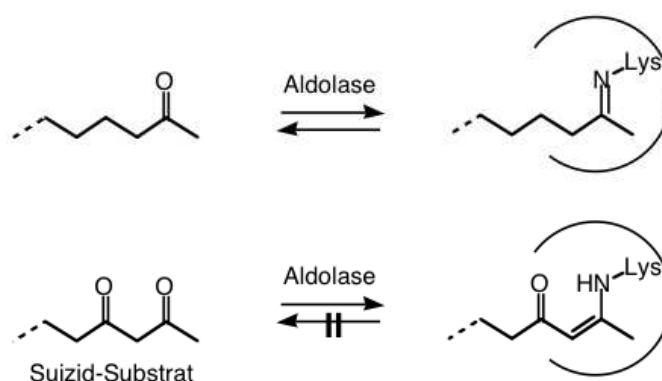


Abbildung 4.2.1. Schematisch Darstellung der irreversiblen Schiffbasen-Bindung der Suizidsubstrate an aktive Aldolasen.

Die kovalent angeknüpften Suizidsubstrate ermöglichen die Durchmusterung großer Bibliotheken von Enzymvarianten mittels Enzympräsentation auf Bakteriophagen oder Hefezellen. Zur Anreicherung eignen sich besonders biotinylierte Substrate, welche suizidaktive und damit biotinylierte Enzyme/Phagen an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten oder Magnet-beads binden.

4.2.1. KONZEPTION, KLONIERUNG UND EXPRESSION DER LYSINVARIANTEN

Die Planung der Konstruktion potenzieller Klasse I-Aldolase-*Scaffolds* durch ortsgerichtete Installation von Lysinresten erfolgte anhand von 3D Struktur-Analysen. Mit Hilfe des *PyMol-Viewers* (Schrödinger) wurden die Aminosäurereste im aktiven Zentrum der Polyketid-Cyclasen im Bereich von 9 Å lokalisiert und geeignete Mutationsstellen ausgemacht. Da die Polyketid-Cyclasen SnoaL und AknH mit gebundenem Substrat kristallisiert wurden, konnte man den Abstand des einzubauenden Lysinrestes zum Substrat genau messen. Die auszutauschenden Aminosäurereste von SnoaL waren N33K, V55K und H107K. Sie wurden durch degenerierte *Primer* mittels SOE-PCR eingefügt (3.2.6.) und über *Sfi*I-Schnittstellen in den pBAD und den pAKds-MT-Vektor kloniert (2.2.) und anschließend löslich produziert und auf der Phagenoberfläche präsentiert. In Abbildung 4.2.2 ist das Klonierungsschema der Lysinvarianten am Beispiel der SnoaL-Lysinvariante V55K schematisch dargestellt. Abbildung 4.2.3. zeigt die durch Lysin ersetzten Aminosäurereste der Polyketid-Cyclase SnoaL.

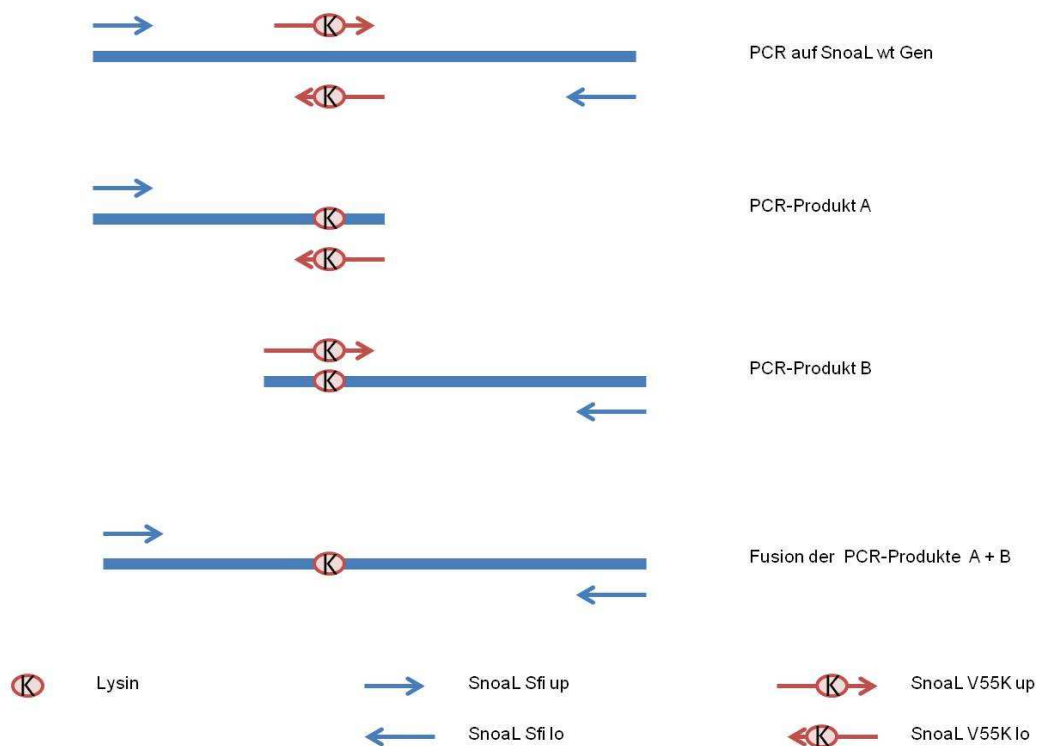


Abbildung 4.2.2.: Klonierungsschema der SnoaL Lysinvarianten mittels SOE-PCR am Beispiel der Lysinvariante SnoaL V55K.

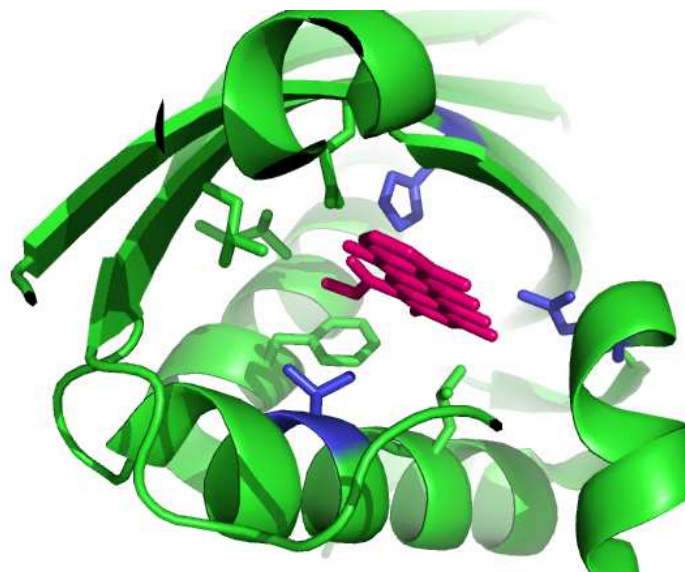


Abbildung 4.2.3.: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums von der Polyketid-Cyclase SnoaL. Das Enzym-Rückgrat ist in grün dargestellt, die durch Lysin zu ersetzenden AS-Reste (N33K, V55K und H107K) sind blau gekennzeichnet. In rot ist das gebundene Substrat (NAME) markiert.

Die Produktion der SnoaL-Lysinvarianten erfolgte analog zum SnoaL-Wildtyp (4.1.3.). In Abbildung 4.2.4. ist die Analyse der jeweiligen 100 und 200 mM Imidazolfraktionen auf einem SDS-Gel gezeigt.

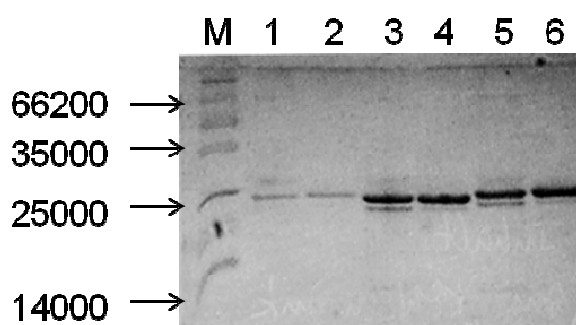


Abbildung 4.2.4.: SDS Gel der SnoaL Lysinvarianten der jeweiligen 100 und 200 mM Imidazolfraktionen. M : Fermentas® Molecular Weight Marker. Spur 1 und 2: H107K; Spur 3 und 4: V55K; Spur 5 und 6: N33K.

In Spur 1 und 2 ist die Lysinvariante H107K aufgetragen. Nach Dialyse dieser Fraktionen konnte eine Proteinausbeute von 1,2 mg aus 1 l Zellkultur fotometrisch ermittelt werden. Die Proteinausbeute der SnoaL Lysinvariante V55K (Abb. 4.2.4. Spur 3 und 4) betrug 7,6 mg aus 1 l Zellkultur. Von der SnoaL Lysinvariante N33K konnte nach Aufreinigung und Dialyse eine Proteinmenge von 3,4 mg aus 1 l Kultur errechnet werden (Abbildung 4.2.4. Spur 5 und 6).

Ein weiteres Kriterium für die Auswahl eines geeigneten Aldolase-Scaffolds war die Präsentierbarkeit der Lysinvarianten auf der Oberfläche von Bakteriophagen. Die Phagenproduktion der einzelnen SnoaL-Lysinvarianten erfolgte in dem pAKds-MT Vektor (2.2.). Dieser Vektor besitzt eine Chloramphenicol-Resistenz und eine DsbA-Signalsequenz, die das Genprodukt als pIII-Fusion in das Periplasma der *E. coli* Zellen transportiert (1.3.1.). Die

Produktion der Phagen wurde, wie in Abschnitt 3.1.3. erläutert, durchgeführt. Als Nachweis der Enzympräsentation auf der Phagenoberfläche wurde ein *Western-Blot* (3.3.5.) durchgeführt. Dabei wurden 15 µl der jeweiligen Phagenproduktion mit 7 µl HOECHST-Puffer versetzt, aufgekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen (3.3.4.). Dieses Gel wurde anschließend *geblotted* (3.3.5.) und der Blot mit den folgenden Antikörpern entwickelt: Als Erstantikörper wurde der anti-pIII-Antikörper (1:5000 verdünnt in PBS) eingesetzt. Der zweite Antikörper war ein anti-Maus Alkalische-Phosphatase Konjugat und wurde 1:2000 in PBS verdünnt eingesetzt. Der fertig entwickelte *Blot* ist in Abbildung 4.2.5. gezeigt.

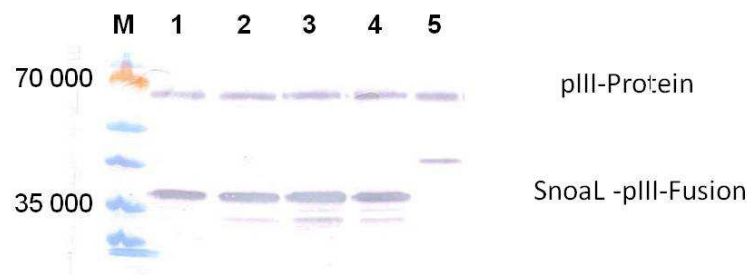


Abbildung 4.2.5.: Western Blot mit SnoaL-Phagen (Wildtyp und Lysinvarianten). M: Marker; 1: SnoaL wt; 2: SnoaL-Variante N33K; 3: SnoaL-Variante V55K; 4: SnoaL-Variante H107K; 5: Phagen mit oberflächenexponierter Superoxid-Dismutase (SOD) als positiv Kontrolle.

Die Banden unterhalb der 70000 Markerbande entsprechen der Laufhöhe des Volllängen-pIII-Proteins der Helferphagen (MW=42609). Die Banden oberhalb der 35000 Markerbande stimmen mit der Größe des SnoaL-pIII-Fusionsproteins überein (MW=38604).

Die Planung der Lysinvarianten der Polyketid-Synthase AknH erfolgte analog zu denen von SnoaL. Die ausgewählten Aminosäure-Mutationen waren L83K, V92K und T128K. Sie wurden ebenfalls mittels SOE-PCR erzeugt (3.2.6.) und über *Sfi*I-Schnittstellen in die Vektoren pBAD und pAKds-MT kloniert (3.2.5.). Der Erfolg der Klonierungen wurde anhand von Testrestriktionen und Sequenzierungen bestätigt.

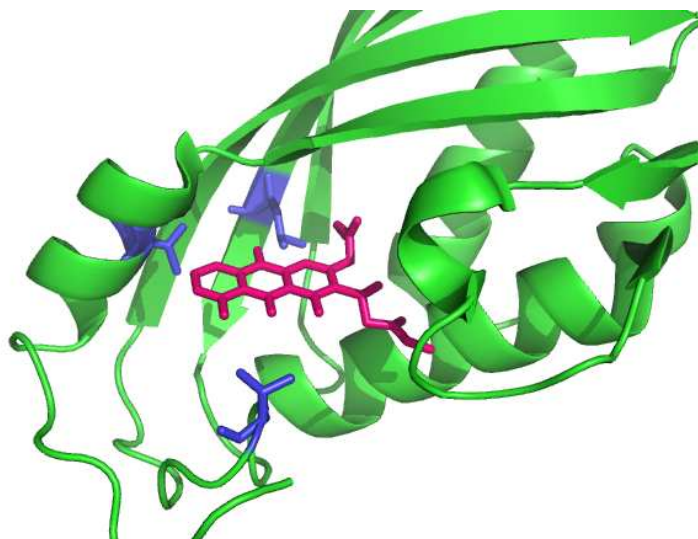


Abbildung 4.2.6.: Pymol-Modell des aktiven Zentrums von der Polyketid-Cyclase AknH. Das Enzym-Rückgrat ist in grün dargestellt, die durch Lysin zu ersetzenden AS-Reste (L83K, V92K und T128K) sind blau gekennzeichnet. In rot ist das gebundene Substrat (NAME) markiert.

Da die Expression der SnoaL Lysinvarianten bereits erfolgreich war und AknH in Struktur und Enzymmechanismus sehr ähnlich ist, wurden die einzelnen Lysinvarianten von AknH nicht im 1 l Maßstab produziert.

Bei der Planung der Lysinvarianten der Sesquiterpen-Synthasen konnte nicht genau ermittelt werden, wo das Substrat im aktiven Zentrum lokalisiert ist, da diese ohne Substrat kristallisiert wurden. Daher wurden nur bei der Pentalenene Synthase in einer ca. 20 Å großen Enzymtasche Aminosäurepositionen ausgesucht, welche in einem Radius von 9 Å zum Inneren des Enzyms zeigen. Die Aminosäurereste in der Nähe der Aspartat-reichen Region wurden nicht in Betracht gezogen, da diese bei der Anordnung des Substrats in der Tasche eine wichtige Rolle spielen. Diese sind für die Stabilisierung des Magnesium-Ions notwendig, welches jedoch bei Klasse I Aldolasen nicht gebraucht wird (Caruthers, 2000). Wie bei den Polyketid-Cyclasen wurden die neuen Gene mit den ausgewählten Aminosäure-Resten I177K, N219K und V301K mittels SOE-PCR amplifiziert (3.2.6.) und in die Plasmide pBAD und pAKds-MT kloniert (3.2.5.).

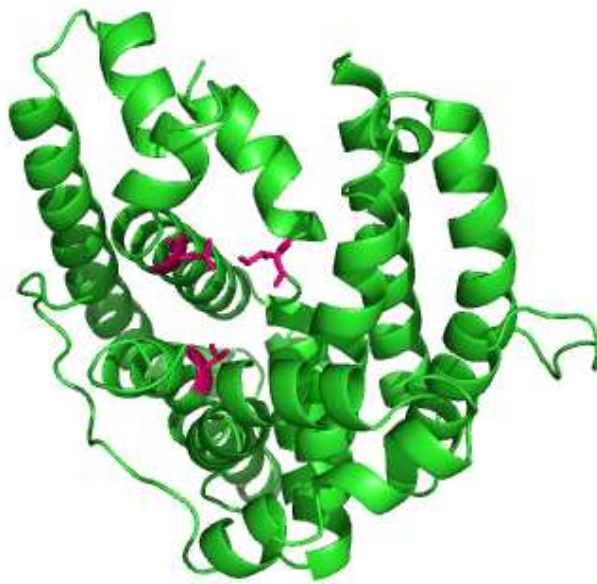


Abbildung 4.2.7.: Modell des aktiven Zentrums von der Pentalenene-Synthase. Das Enzym-Rückgrat ist in grün dargestellt, die durch Lysin zu ersetzenden AS-Reste (I177K, N219K und V301K) sind rot gekennzeichnet.

Die lösliche Produktion der Lysinvarianten der Pentalenene Synthase erfolgte im 500 ml Maßstab, aber ansonsten analog zum Pentalenene-Wildtyp (4.1.3.). In Abbildung 4.2.8. ist die Analyse der jeweiligen 60-200 mM Imidazolfraktionen auf einem SDS-Gel gezeigt.

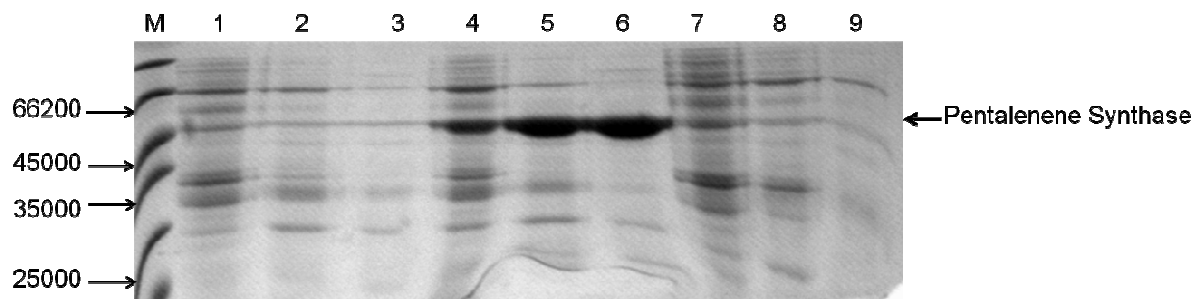


Abbildung 4.2.8. SDS-Gel der IMAC-Aufreinigung der Lysinvarianten der Pentalenene Synthase (PS). M : Fermentas® *Molecular Weight Marker*. 1: 60 mM Imidazol-Fraktion der PS Lysinvariante I177K, 2: 100 mM Imidazol-Fraktion der PS Lysinvariante I177K, 3: 200 mM Imidazol-Fraktion der PS Lysinvariante I177K, 4: 60 mM Imidazol-Fraktion der PS Lysinvariante N219K, 5: 100 mM Imidazol-Fraktion der PS Lysinvariante N219K, 6: 200 mM Imidazol-Fraktion der PS Lysinvariante N219K, 7: 60 mM Imidazol-Fraktion der PS Lysinvariante V301K, 8: 100 mM Imidazol-Fraktion der PS Lysinvariante V301K, 9: 200 mM Imidazol-Fraktion der PS Lysinvariante V301K.

In den Spuren 1-3 ist die Lysinvariante I177K aufgetragen, es konnte jedoch keine signifikante Bande in der richtigen Größe auf dem SDS-Gel gefunden werden (MW=38110). Die Proteinausbeute der Pentalenene Lysinvariante N219K (Abb. 4.2.8. Spur 4-6) betrug 5,5 mg aus 500 ml Zellkultur. Von der Lysinvariante V301K konnte ebenfalls keine signifikante Bande auf dem SDS-Gel ermittelt werden (Spur 7-9).

4.2.2. ETABLIERUNG EINES FLUORESCENZBASIERTEN ASSAYS ZUR IDENTIFIKATION AKTIVER LYSINVARIANTEN

Zur Identifikation aktiver Aldolase-I Varianten sollte ein fluoreszenzbasierter Assay etabliert werden. In diesem Assay fungiert Methodol (Abbildung 4.2.9.) als Substrat für eine *Retro*-Aldolreaktion aktiver Aldolase-Varianten, das dabei entstehende Produkt ist 6-methoxy-2-naphthaldehyd (List, 1998). Dieser sog. Aldolsensor fluoresziert bei einer Wellenlänge von 452 nm, wenn er bei einer Wellenlänge von 330 nm angeregt wird.

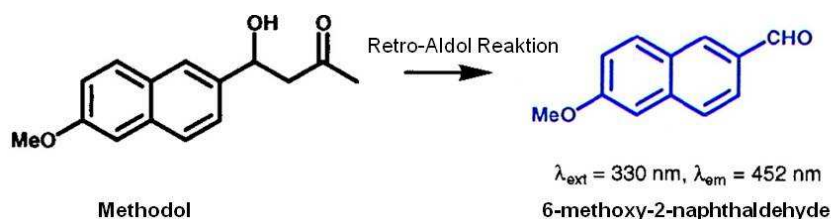


Abbildung 4.2.9.: *Retro*-Aldol Reaktion mit Methodol als fluorogenem Marker. Modifiziert nach List, 1998.

Die Durchführung des Assays erfolgte wie unter 3.1.6. beschrieben mit den Lysinvarianten N33K, V55K und H107K der Polyketid-Cyclase SnoaL, der AknH-Varianten L83K, V92K und T128K und der Pentalenene-Variante N219K. Als Kontrollen dienten Lysin (1 mM in PBS) (Abbildung 4.2.10. Reihe 2) und 50 μM des Reaktionsprodukts 6-Methoxy-2-naphthaldehyd in PBS (Abbildung 4.2.10. Reihe 1). Außer bei den Positiv-Kontrollen konnte keine Fluoreszenz im ELISA-Reader detektiert werden (Abbildung 4.2.10.), was bedeutet, dass die eingebauten Lysinreste nicht aktiv waren.

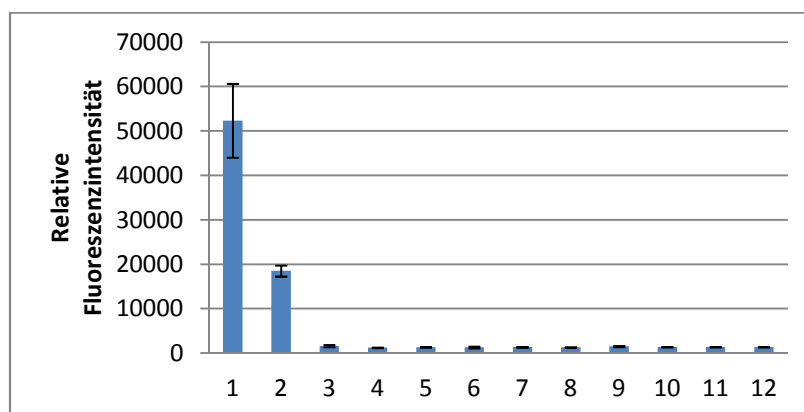


Abbildung 4.2.10.: Dreifachbestimmung der ELISA-Reader Messung der *Retro*-Aldol Reaktion der produzierten Lysinvarianten. Reihe 1: 6-methoxy-2-naphthaldehyd; Reihe 2: Lysin; Reihe 3: SnoaLwt; Reihe 4: SnoaL N33K; Reihe 5: SnoaL V55K; Reihe 6: SnoaL H107K; Reihe 7: AknHwt; Reihe 8: AknH L83K; Reihe 9: AknH V92K; Reihe 10: AknH T128K; Reihe 11: Pentalenene Synthase wt; Reihe 12: Pentalenene Synthase N219K.

Um einen Lysinrest zu aktivieren, müssen die umgebenen Aminosäuren bei physiologischen pH-Wert eine Deprotonierung des Lysinrests erleichtern, damit dieser als Nukleophil reagieren kann. Um dies zu bewerkstelligen, wurden Aminosäure-Positionen in der näheren Umgebung

der Lysinreste ausgewählt und mit Hilfe gerichteter Evolution randomisiert. So sollten durch die Einflüsse der benachbarten Reste die eingebauten Lysinreste als Schiff-Base reagieren können.

4.3. ERZEUGUNG VON MUTEINBIBLIOTHEKEN DURCH RANDOMISIERTE MUTAGENESE

4.3.1. KONZEPTION, KLONIERUNG UND EXPRESSION EINER SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEK BASIEREND AUF DER LYSINVARIANTE V55K

Für die rekombinante Synthese der SnoaL-Muteinbibliothek I (teilrandomisiertes SnoaL) wurde aus Gründen zeitlicher und arbeitstechnischer Ökonomie rationales *Design* und gelenkte Evolution kombiniert. Da die SnoaL-Lysinvariante V55K in den vorherigen Expressionstests (4.2.1.) die größte Proteinausbeute zeigte und außerdem auf der Phagenoberfläche präsentierbar ist (Abbildung 4.2.3.), wurde sie als Ausgangspunkt der Muteinbibliothek gewählt. Es wurden vier randomisierte Positionen in unmittelbarer Substratnähe und benachbarter Umgebung des Lysinaustauschs eingefügt. Mit Hilfe des *PyMol*-Programms wurden, wie auch bei der Erzeugung der Lysinvarianten, die zu randomisierenden Positionen in einem Radius von 9 Å in der Substrattasche ausgewählt. Der Einbau der Mutationen erfolgte an den Positionen F48, L51, F59 und A63 (Abbildung 4.3.1. in Gelb dargestellt).

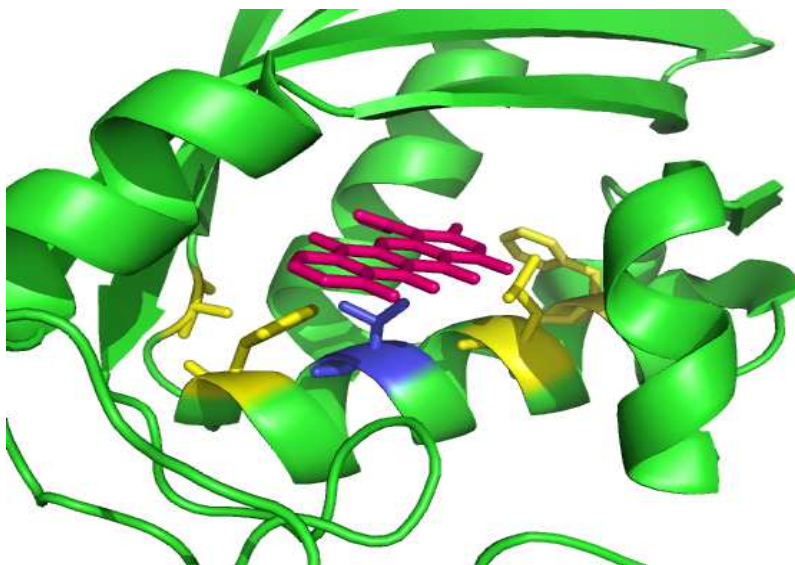


Abbildung 4.3.1.: Modell der SnoaL Muteinbibliothek I basierend auf der Lysinvariante V55K. Das Enzym-Rückgrat ist in grün dargestellt, der durch Lysin ersetzte AS-Rest ist rot gekennzeichnet. In Gelb sind die mutierten Aminosäurereste F48, L51, F59 und A63 abgebildet.

Die SnoaL-Muteinbibliothek I wurde mit Hilfe von SOE-PCR über degenerierte *Primer* mit NNS-Kodierung generiert (3.2.6.). Dabei steht N für die Basen A, C, G und T und S steht für den Einbau der Basen G und C (Barbas III, 2004), was zu einer Diversität auf DNA-Ebene von $32^4=1048576$ führt. Anschließend wurde das neue Genkonstrukt zur löslichen Produktion in den pBAD-Vektor kloniert. In Abbildung 4.3.2. ist ein Schema der Klonierung dargestellt.

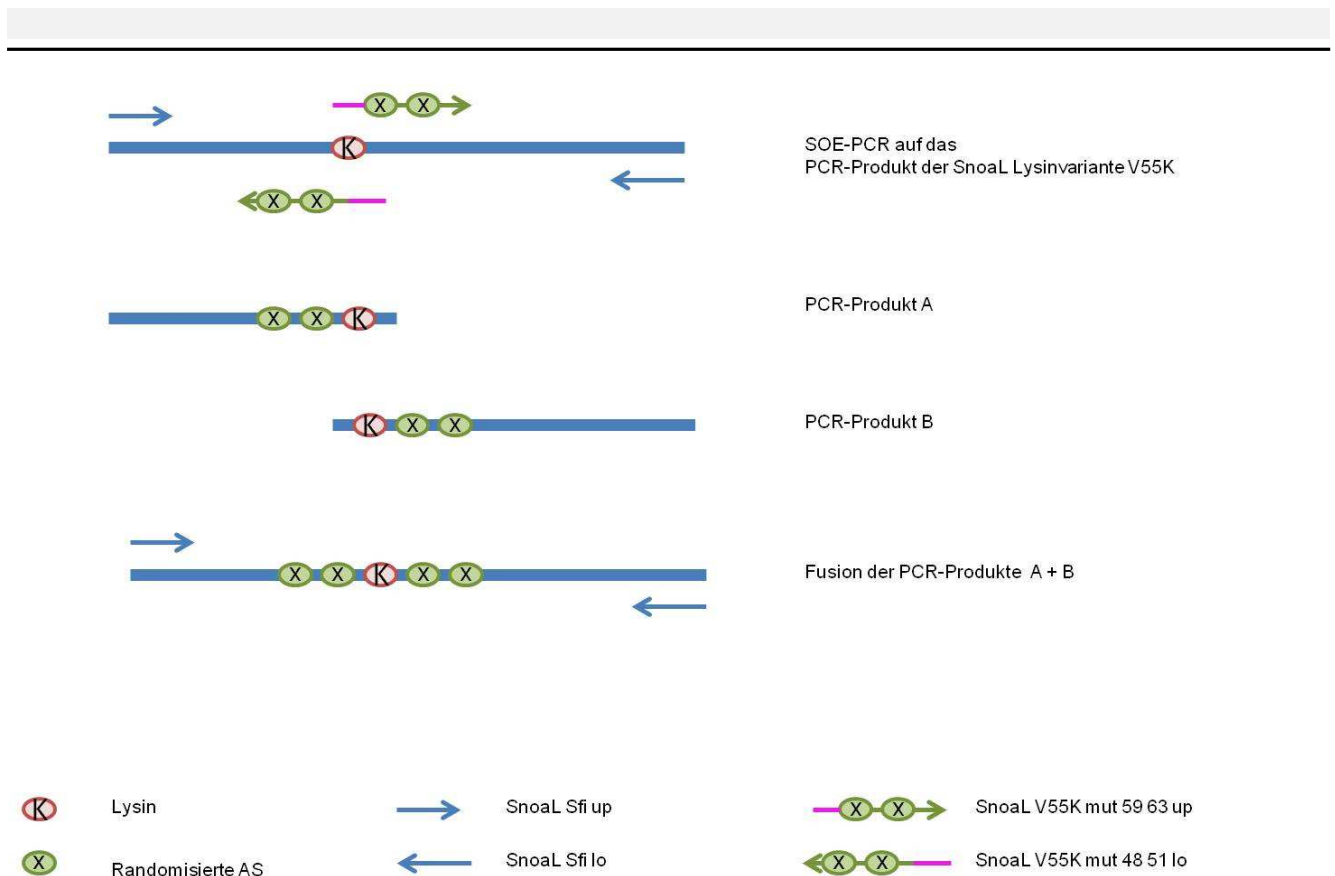


Abbildung 4.3.2. Klonierungsschema der SnoaL-Muteinbibliothek I basierend auf der Lysinvariante V55K.

Als *Template* diente bei beiden PCR-Reaktionen das aufgereinigte PCR-Produkt der SnoaL Lysinvariante V55K. Die einzelnen SOE-PCR Fragmente des randomisierten Gens wurden über die Oligonukleotide *SnoaL V55K mut 59 63 up* und *SnoaL V55K mut 48 51 lo* in einer abschließenden PCR fusioniert und das neue Genkonstrukt mit den Außen-Primern *SnoaL Sfi up* und *SnoaL Sfi lo* amplifiziert (3.2.6.). Nach Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem PCR-Clean-up Kit (Promega), wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *SfiI* angesetzt. Das Vektor-*backbone* pBAD wurde ebenfalls mit *SfiI* verdaut und anschließend über einen Sucrose-Gradienten gereinigt (3.2.7.). Die so vorbereiteten Edukte wurden, wie in 3.2.5. beschrieben, zur Ligation eingesetzt. Es wurden insgesamt acht Ligationsansätze zur Transformation elektrokompenter *E. coli* Top10 Zellen verwendet (3.1.4.). Auf insgesamt 26 großen dYT-Amp Platten konnte eine Klonzahl von $6,5 \times 10^7$ erzeugt werden. Diese wurden mit frischem dYT-Medium von den Platten geschwemmt und zur Lagerung bei -80°C mit 10 % DMSO versetzt. In einer Kolonie-PCR wurden einzelne Klone auf das vorhandene Insert hin überprüft. Die Analyse der PCR auf einem Agarosegel (3.2.2.) bestätigte das Vorhandensein des Inserts in 10 von 10 untersuchten Klonen (Abbildung 4.3.3.A, Spur 1-10).

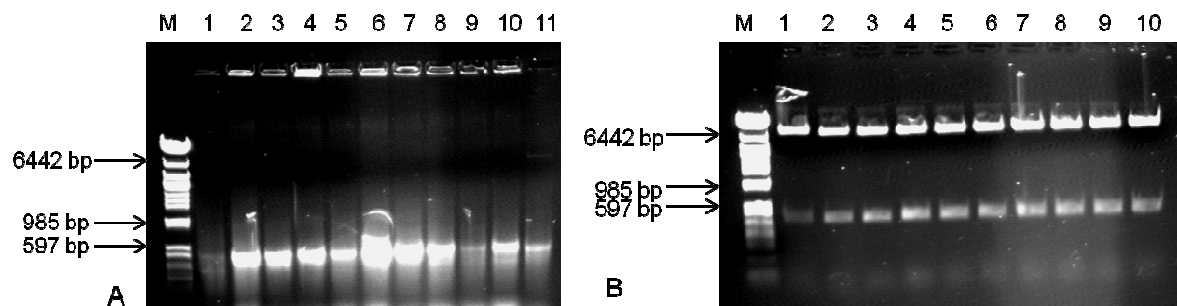


Abbildung 4.3.3.: Analytische Agarosegele A: Kolonie-PCR der SnoaL Muteinbibliothek I in pBAD. Spur 1-10: Einzelklone 1-10; Spur 11: pBAD-SnoaLwt als Positiv-Kontrolle. B: Testrestriktion der Klone 1-10 (Spur 1-10) mit dem Enzym *SfiI*. M: λ DNA/*Eco47I* (*Avall*) Marker (Fermentas).

Eine weitere Analyse einzelner Klone erfolgte durch Restriktionsspaltung der isolierten Plasmid-DNA mit dem Enzym *SfiI* (3.2.5.) (Abbildung 4.3.3.B) und anschließender Sequenzierung. Anhand der Sequenzierung konnten die Aminosäure-Sequenzen der 10 Klone mit Hilfe des Programms *Bioedit* mit der Sequenz des SnoaL-Wildtyps verglichen werden. Es konnte bestätigt werden, dass die sequenzierten Klone an den zu randomisierten Positionen unterschiedliche Aminosäurereste besitzen (siehe Anhang 9.2.).

Die Produktion von ca. 300 Einzelklonen der SnoaL-Muteinbibliothek I erfolgte in drei *deep-well*-Platten wie unter 3.1.6. beschrieben über Nacht bei 30 °C nach Zugabe von 0,2 % Arabinose. Nach anschließender Lyse der Zellen, wurden die SnoaL-Varianten über ein *His-tag* mit Hilfe von Nickel-*beads* aufgereinigt (3.1.6.). Exemplarisch wurde von drei Proteinvarianten der erste Waschschrift von den Nickel-*beads* (15 μ l) und die aufgereinigte Proteinfraction nach Elution von den Partikeln (15 μ l) auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 4.3.4.)

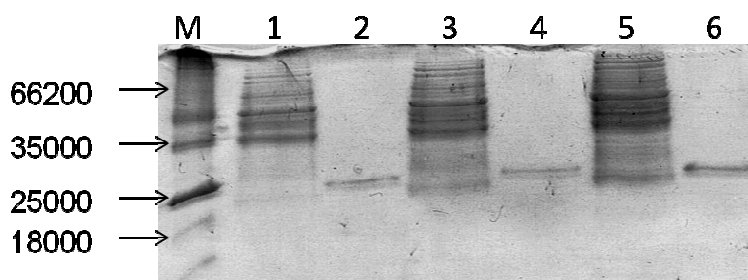


Abbildung 4.3.4.: Proteinreinigung von drei exemplarischen Varianten der SnoaL-Muteinbibliothek I. 1, 3 und 5: Überstände nach Inkubation der Ansätze mit den Nickel-*beads*. 2, 4 und 6: Proben nach Elution von den Nickel-*beads*.

In Abbildung 3.3.4. ist anhand der drei ausgesuchten Varianten zu erkennen, dass die Aufreinigung der SnoaL-Varianten mit den Nickel-NTA-*beads* erfolgreich war. In Spur 2, 4 und 6 sind die aufgereinigten SnoaL-Varianten aufgetragen.

4.3.2. Klonierung UND PRODUKTION EINER SNOAL-PHAGENBIBLIOTHEK

Da sich die löslich produzierte SnoaL-Muteinbibliothek I (4.3.1.) nicht zum Hochdurchsatz-*Screening* eignet, wurde diese Bibliothek zusätzlich auf der Oberfläche von Phagen präsentiert.

In den vorangegangenen Versuchen (4.2.1.) konnte gezeigt werden, dass das SnoaL-Wildtyp Enzym und dessen Lysinvarianten auf der Phagenoberfläche präsentierbar ist.

Das SOE-PCR-Produkt der SnoaL-Muteinbibliothek I (4.3.1.) wurde in das zuvor mit *Sfi*I-gespaltene und Sucrose-Gradienten gereinigte Vektor-*backbone* pAKds-MT (2.2.) kloniert. Wie bei der Erstellung der löslichen SnoaL-Muteinbibliothek wurden insgesamt acht Ligationen angesetzt. Diese wurden zur Transformation elektrokompeter *E. coli* ER2738 Zellen verwendet (3.1.4.). Diese Zellen besitzen einen F-Pilus und sind somit für eine Phageninfektion zugänglich. Es konnte eine Bibliothek mit 3×10^7 funktionellen Klonen generiert werden, was anhand von Kolonie-PCR (Abbildung 4.3.5.) und Testspaltungen mit *Sfi*I von Einzelklonen bestätigt wurde.

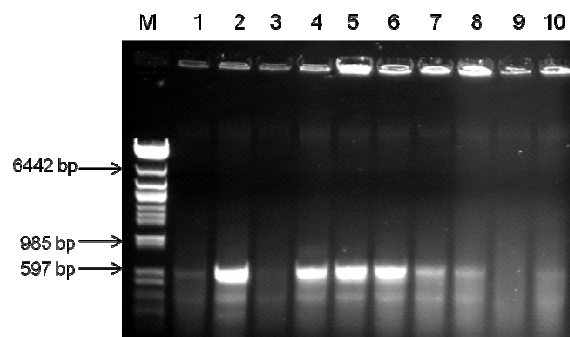


Abbildung 4.3.5.: Analytisches Agarosegel: Kolonie-PCR der SnoaL Muteinbibliothek I in pAKds-MT. Spur 1-10: Einzelklone 1-10. M: λ DNA/*Eco*47I (*Aval*I) Marker (Fermentas).

Nach Zugabe von 10 % DMSO wurde die Bibliothek bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C bis zum späteren *Screening* gelagert. Die Produktion der Phagen erfolgte wie in Methode 3.1.3. beschrieben.

4.3.3. KONZEPTION, KLONIERUNG UND ERSTELLUNG EINER SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEK ZUR OBERFLÄCHEN-PRÄSENTATION AUF *S. CEREVISIAE*

Ein weiteres Verfahren zur Durchmusterung großer Proteinbibliotheken ist das *Yeast-Display* (1.3.2.). Der Vorteil des *Yeast-Displays* gegenüber des *Phage-Displays* ist, dass ein *high throughput screening* mithilfe des *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) auf den gewünschten Phänotyp ermöglicht wird.

Für die Erstellung einer SnoaL-Muteinbibliothek auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* wurden komplett neue Aminosäurepositionen im SnoaL-Gen randomisiert (Abbildung 4.3.6.).

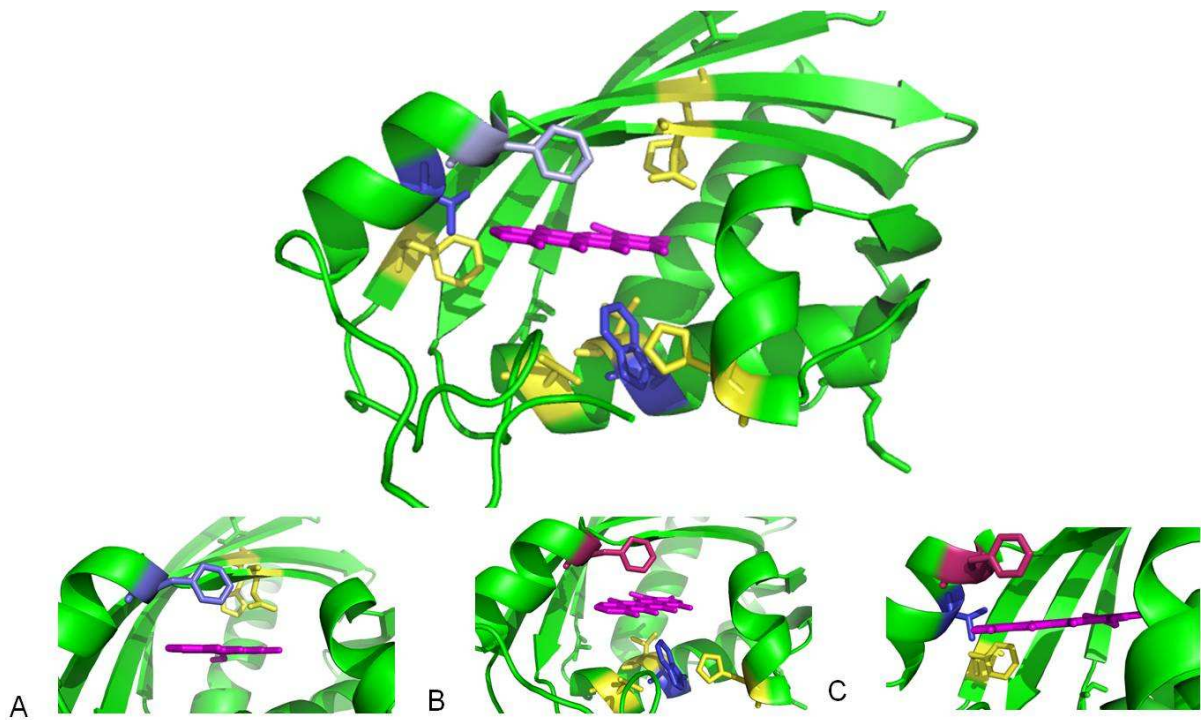
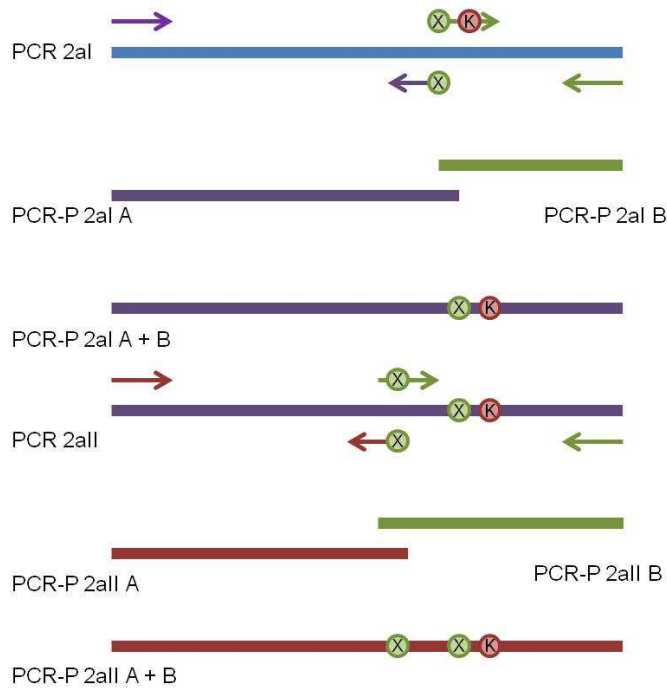


Abbildung 4.3.6.: Modell der Snoal-Muteinbibliothek II. A: Unterbibliothek 2a, B: Unterbibliothek 2b, C: Unterbibliothek 2c. Das Enzym-Rückgrat ist in grün dargestellt, die durch Lysin ersetzte AS-Rest sind blau gekennzeichnet. In Gelb sind an den Positionen H107, D121, H39, V55, T58 und F101 die mutierten Aminosäurereste abgebildet. Die rot markierten Aminosäurereste stellen den Austausch von F125 zu Alanin dar. In rosa ist das gebundene Substrat von Snoal gekennzeichnet.

Die Auswahl der zu randomisierenden Positionen geschah über Strukturanalysen mit Hilfe des *PyMol*-Programms. Dabei wurden Aminosäurereste ausgewählt, welche in einem Radius von 9 Å in das Innere der Substrattasche zeigen. Um mehrere Positionen gleichzeitig abzudecken wurde die Snoal-Muteinbibliothek II in drei Unterbibliotheken aufgeteilt. Snoal-Mut-Bib 2aII wurde an den Aminosäurepositionen H107 und D121 randomisiert und anstelle von Phenylalanin an der Position 125 wurde ein Lysin eingebaut (Abbildung 4.3.6.A). Bei der Snoal-Mut-Bib 2bIII wurden die Aminosäuren H39, V55 und T58 mutiert. Das Tryptophan an Position 54 wurde durch ein Lysin ersetzt und das Phenylalanin an Position 125 durch ein Alanin. Das Alanin an der Position 125 wurde deshalb gewählt, weil somit ein größerer Zugang zu der Substrattasche gewährleistet wurde. Darum wurde auch in Unterbibliothek 2cII dieser Austausch vorgenommen. Weitere Aminosäure-Austausche wurden an den Positionen F101 und T128 vorgenommen. Dabei wurde das Phenylalanin randomisiert und das Tyrosin durch ein Lysin ersetzt (Abbildung 4.3.6.C). Die Erstellung der neuen Genkonstrukte erfolgte, wie auch bei der Snoal-Muteinbibliothek I, durch den Einbau von Mutationen mittels SOE-PCR. In Abbildung 4.3.7. ist ein Schema der einzelnen PCR-Schritte gezeigt, die für die Generierung der Genkonstrukte erforderlich waren.



SOE-PCR I auf SnoaL-wt Gen
 Primer für A: pCT OL Sfi up / 2a D121 F125 lo
 Primer für B: 2a D121 F125 up / pCT OL Sfi lo

Fusion der SOE-PCR-Produkte 2aI A und B

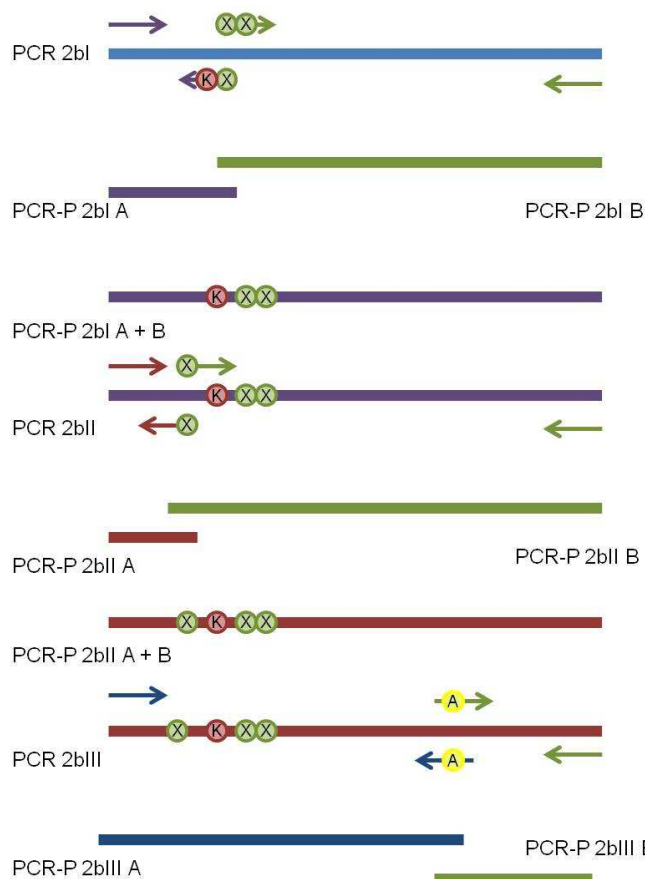
PCR-P 2aI

SOE-PCR II auf PCR-P 2aI
 Primer für A: pCT OL Sfi up / 2a H107 lo
 Primer für B: 2a H107 up / pCT OL Sfi lo

Fusion der SOE-PCR-Produkte 2aII A und B

PCR-P 2aII

A



SOE-PCR I auf SnoaL-wt Gen
 Primer für A: pCT OL Sfi up / 2b W54K V55 T58 lo
 Primer für B: 2b W54K V55 T58 up / pCT OL Sfi lo

Fusion der SOE-PCR-Produkte 2bI A und B

PCR-P 2bI

SOE-PCR II auf PCR-P 2bI
 Primer für A: pCT OL Sfi up / 2b H39 lo
 Primer für B: 2b H39 up / pCT OL Sfi lo

Fusion der SOE-PCR-Produkte 2bII A und B

PCR-P 2bII

SOE-PCR III auf PCR-P 2bII
 Primer für A: pCT OL Sfi up / 2b F125A lo
 Primer für B: 2b F125A up / pCT OL Sfi lo

Fusion der SOE-PCR-Produkte 2bIII A und B

PCR-P 2bIII

B

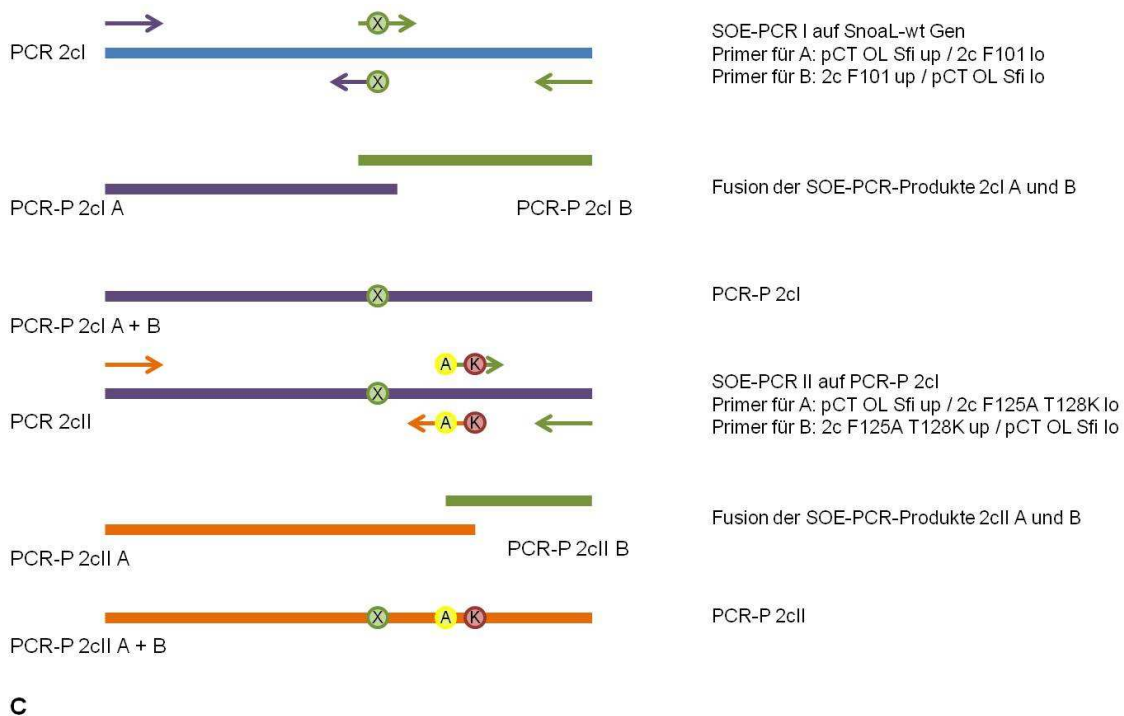


Abbildung 4.3.7. Schema zur Erstellung der PCR-Produkte der einzelnen Unterbibliotheken der SnoaL-Muteinbibliothek II. A: Unterbibliothek 2aII, B: Unterbibliothek 2bIII, C: Unterbibliothek 2cII.

Die einzelnen SOE-PCRs wurden getrennt voneinander durchgeführt (3.2.6.). Und die SnoaL-Gene wurden über homologe Rekombination in den pCT-Vektor eingebracht. Eine Ligation war somit nicht nötig. Das Plasmid pCT-EGFR, welches von der Arbeitsgruppe J. Cochran (Stanford University) zur Verfügung gestellt wurde, dient der Oberflächenpräsentation von Enzymvarianten auf der Oberfläche von *S. cerevisiae*. Dieser Vektor besitzt als *shuttle*-Vektor einen Replikationsursprung für *E. coli* (pBR322) und *S. cerevisiae* (ARS4/CEN6). Vor der Transformation der Hefe-Zellen wurde dieses Plasmid mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *BamHI* verdaut und mit Hilfe eines Sucrose-Gradienten gereinigt. Die Transformation der Hefe-Zellen erfolgte, wie in Abschnitt 3.1.4.2. beschrieben. Es wurden für jede Unterbibliothek drei Transformationen durchgeführt. Nach Auszählen der Klone auf den Verdünnungsplattierungen und einer Kolonie-PCR (Abbildung 4.3.8.) konnten für die SnoaL-Muteinbibliothek 2aII 9×10^5 funktionelle Klone erzeugt werden. Bei der Unterbibliothek 2bIII waren es 3×10^5 funktionelle Klone und bei der Muteinbibliothek 2cII 1×10^6 .

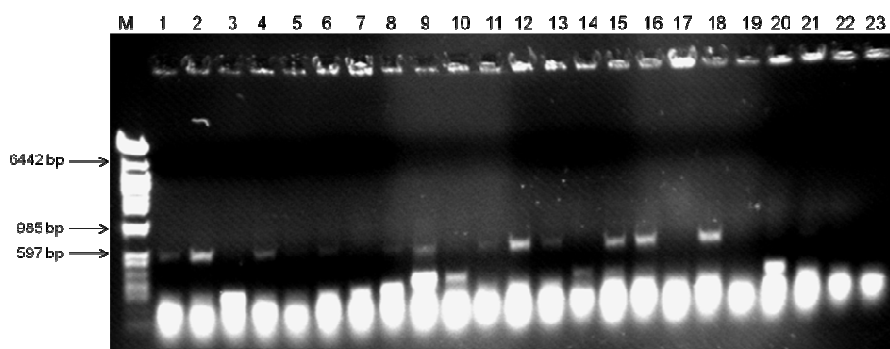


Abbildung 4.3.8.: Analytisches Agarosegel: Kolonie-PCR der Snoal Muteinbibliothek I in pCT. Spur 1-8: Einzelklone 1-8 der Snoal-Muteinbibliothek 2aII; Spur 9-16: Einzelklone 1-8 der Snoal-Muteinbibliothek 2bIII; Reihe 17-23: Einzelklone 1-7 der Snoal-Muteinbibliothek 2cII. M: λ DNA/*Eco47I* (*Avall*) Marker (Fermentas).

Die kultivierten Hefezellen der einzelnen Bibliotheken wurden bei einer OD_{600} von 9 geerntet. Sie wurden zentrifugiert und jeweils in insgesamt 10 ml *freezing-solution* aufgenommen. In Aliquotes à 2 ml wurden die Snoal-Muteinbibliotheken bei -80°C gelagert. Die Anzucht der Hefezellen erfolgte wie in Methode 3.1.2. beschrieben.

4.4. SYNTHESE UND BIOTINYLIERUNG VON *SCREENING*-SUBSTRATEN

4.4.1. SYNTHESE DER SUIZIDSUBSTRATE

Die Synthese der Suizidsubstrate wurde von Frau Dipl. Chem. Deniz Güclü aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Fessner (TU-Darmstadt) durchgeführt (3.5.1.). Es wurden ein 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dion (NH_2 -Diketon) (MW=191 g/mol) und eine COOH-Linkervariante des Diketon-Derivats (MW=320 g/mol) bereitgestellt (Abbildung 4.4.1.A und B).

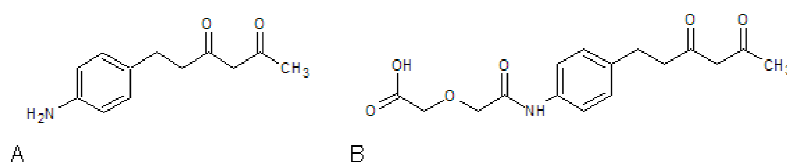


Abbildung 4.4.1.: Darstellung der bereitgestellten Suizidsubstrate. A: 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dion (NH_2 -Diketon) (MW=191 g/mol); B: COOH-Linkervariante des Diketon-Derivats (MW=320 g/mol).

4.4.2. BIOTINYLIERUNG UND AUFRÄUIGUNG DER SUIZIDSUBSTRATE

Die Biotinylierung der Suizidsubstrate erfolgte, wie unter 3.5.2. beschrieben. Zunächst wurde das 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dion (NH_2 -Diketon) mit NHS-Biotin konjugiert und anschließend mit Hilfe der HPLC analysiert (3.4.2.). Die markierten *peaks* (Abbildung 4.4.2.B) konnten mittels MS eindeutig zugewiesen werden (siehe Anhang 9.3.).

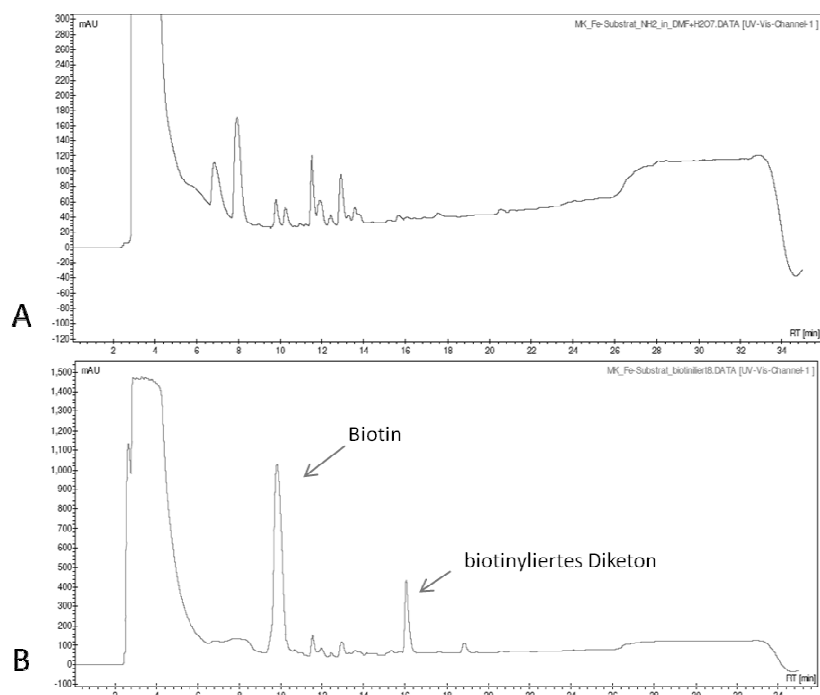


Abbildung 4.4.2.: HPLC-Chromatogramme des 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dions. A: vor der Biotinylierung. B: nach der Biotinylierung. Gradient: 9:54 (Eluent B: Eluent A).

Das unaufgereinigte Substrat wurde bei -20°C gelagert und für die Durchmusterung der Phagenrunden von 4.5.2. eingesetzt. Nachdem festgestellt wurde, dass die Durchmusterung der SnoaL-Phagenbibliothek nach 3.1.5. mit dem biotinylierten NH_2 -Derivat (6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dion) erfolglos war (Tabelle 4.5.1.), wurde dieses erneut in der HPLC analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass das Produkt der Biotinylierung über die Zeit von vier Monaten zerfallen war. Die gekennzeichneten *peaks* (Abbildung 4.4.3.B) konnten bei MS-Analyse nicht mehr dem Ausgangsprodukt (markierter *peak* Abbildung 4.4.3.A) zugewiesen werden. In Abbildung 4.4.2.B ist die HPLC-Analyse des zerfallenen Diketon-Derivats gezeigt.

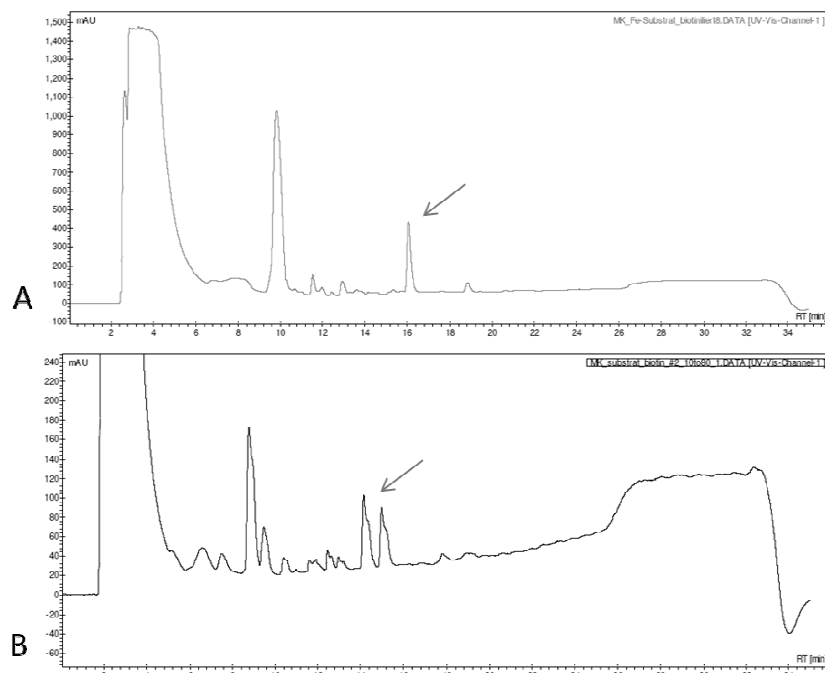


Abbildung 4.4.3.: HPLC-Chromatogramme des 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dions. A: direkt nach der Biotinylierung. B: vier Monate nach der Biotinylierung bei Lagerung bei -20 °C. Die Pfeile weisen auf das Produkt vorher und nachher. Gradient: 9:54 (Eluent B: Eluent A).

Es folgte die erneute Biotinylierung des 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dions (3.5.2.) mit anschließender Aufreinigung über die analytische HPLC (3.5.1.) (Abbildung 4.4.4.).

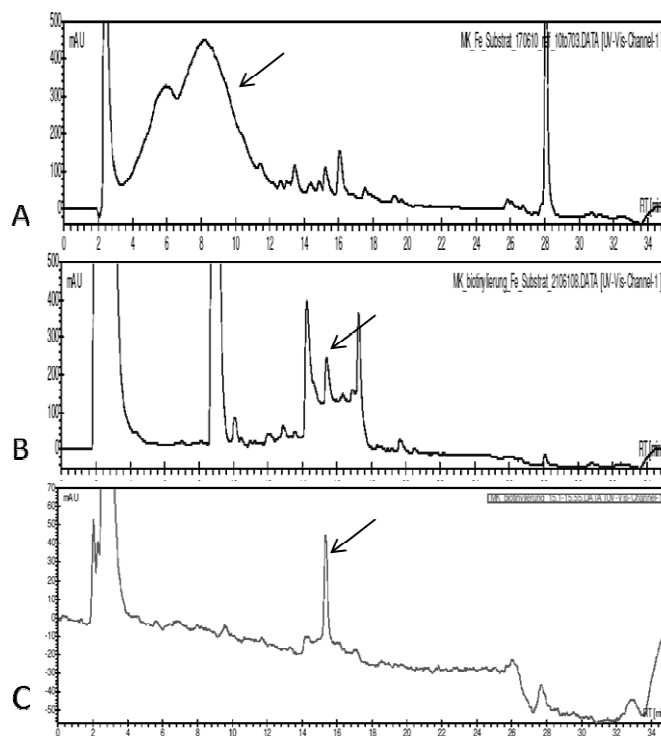


Abbildung 4.4.4.: HPLC-Diagramme des 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dions. A: Ausgangsprodukt vor der Biotinylierung. B: nach der Biotinylierung. C: nach Aufreinigung des Produkts über die analytische HPLC. Die Pfeile weisen auf das Produkt vorher und nachher. Gradient: 9:54 (Eluent B: Eluent A).

Die korrekte Masse des aufgereinigten Produkts wurde anschließend in der LC-MS bestätigt (siehe Anhang). Das biotinylierte 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dion wurde für die weiteren *Phage-Display Screenings* der SnoaL-Muteinbibliothek eingesetzt (4.5.2.).

Da bei der Aufreinigung des biotinylierten NH₂-Diketon-Derivats ein großer Teil verloren ging, reichte das gereinigte Produkt nicht für alle *Screenings* aus. Daher wurde zusätzlich die stabilere Carboxy-Linkervariante mit Biotin-Amin umgesetzt (3.5.2.). Da das Ausgangsprodukt jedoch schon in unreinem Zustand geliefert wurde, wurde versucht das Produkt vor der Biotinylierung mittels HPLC von den Nebenprodukten zu trennen. Dies war jedoch nicht möglich, da sich bei LC-MS-Analysen Spuren der korrekten Masse in jedem *peak* auffinden konnten (Daten nicht gezeigt). Daher wurde das verunreinigte Ausgangsprodukt für die Biotinylierung eingesetzt (Abbildung 4.4.5.).

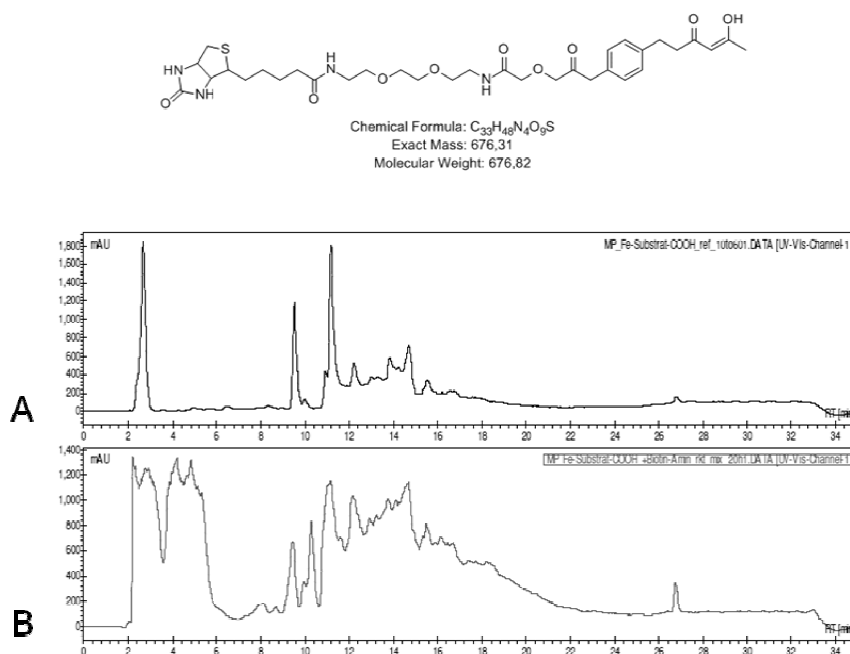


Abbildung 4.4.5.: Chemische Formel des biotinylierten Produkts der Carboxy-Linkervariante und analytische HPLC-Diagramme des COOH-Diketon-Derivats. A: vor der Biotinylierung. B: nach der Biotinylierung. Gradient: 9:54 (Eluent B: Eluent A).

Nach der Biotinylierung wurde versucht, das Produkt von den unzähligen Nebenprodukten über die präparative HPLC zu trennen (Abbildung 4.4.6.A). Jedoch zeigte die Analyse der gesammelten *peaks* in der analytischen HPLC (Abbildung 4.4.6.1-6), dass auch diese Trennung nicht erfolgreich war. Das gesuchte Produkt konnte mit einer Retentionszeit von 12 min auf der analytischen HPLC detektiert werden (verifiziert mittels MS, Massenspektren im Anhang). Um eine annehmbare Substratausbeute zu erhalten, wurden die gesammelten *peaks* 2, 5 und 6 (Abbildung 4.4.6.) vereinigt und lyophilisiert.

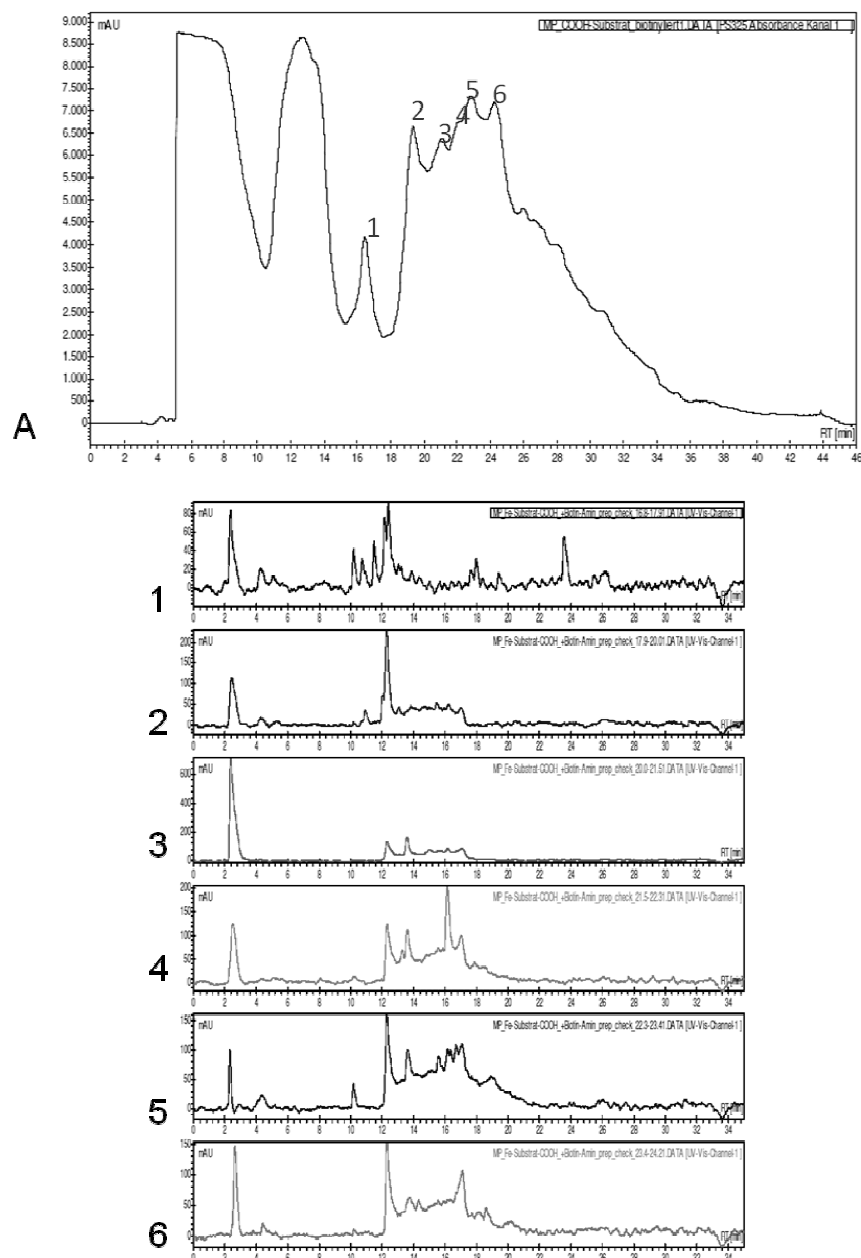


Abbildung 4.4.6.: HPLC-Diagramme des COOH-Diketon-Derivats. A: präparative HPLC nach der Biotinylierung (Gradient 9:74). 1-6: Analytische HPLC-Diagramme der einzelnen gesammelten *peaks* aus der präparativen HPLC. Gradient: 9:54 (Eluent B: Eluent A).

Nach Auswiegen des Lyophilisats verblieben 2 mg. Das biotinylierte Produkt wurde in 2 ml Wasser mit 10 % DMF aufgenommen und nach erneuter HPLC-Analyse bei -20 °C gelagert.

4.4.3. UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT DES BIOTINYLIERTEN SUIZID-SUBSTRATS MIT ALDOLASE AK 38C2

Um zu untersuchen, ob das aufgereinigte, biotinylierte Suizidsubstrat funktionstüchtig ist wurde der Aldolase-Antikörper 38C2 (Sigma-Aldrich) eingesetzt. Dieser Antikörper ist in der Lage nach dem Enamin-Mechanismus von Klasse I Aldolasen eine Aldolreaktion zu katalysieren (Wagner, 1997) und sollte somit in der Lage sein, das biotinylierte Suizidsubstrat zu binden. Die Bindung

kann über Extravidin-Peroxidase-Konjugat anhand einer Farbreaktion der Peroxidase nachgewiesen werden. In Abbildung 4.4.7. ist der Versuch schematisch dargestellt.

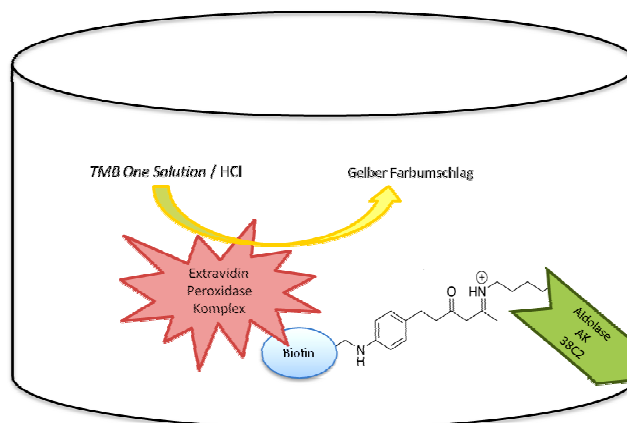


Abbildung 4.4.7.: Schema des ELISA-Tests zur Funktionalität des biotinylierten Suizidsubstrats.

Zunächst wurden 10 µg des Antikörpers in insgesamt 100 µl PBS in die *wells* (Abbildung 4.4.6. Spur 1 und 2) einer *Nunc-Maxisorp*-Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten dreimalig mit PBS gewaschen und mit 300 µl Blocklösung (3 % Milchpulver in PBS) für zwei Stunden bei 30 °C versetzt (Abbildung 4.4.6. Spur 1, 2 und 3). Nach erneutem Waschen mit PBS wurden 10 µl (ca. 100 µM) des biotinylierten und gereinigten NH₂-Diketon-Derivats mit 90 µl PBS in die *wells* (Abbildung 4.4.6. Spur 1 und 3) gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 30 °C wurde der Ansatz erneut gewaschen (10x mit PBS) und 100 µl Extravidin-Peroxidase-Konjugat (1:1000 in PBS) für eine weitere Stunde hinzugegeben. Nach einem abschließenden Waschschrift (10x mit PBS) erfolgte die Entwicklung mit *TMB One Solution* und HCl. Das Ergebnis einer Dreifachbestimmung wurde im *ELISA-Reader* bei 450 nm detektiert (Abbildung 4.4.8.).

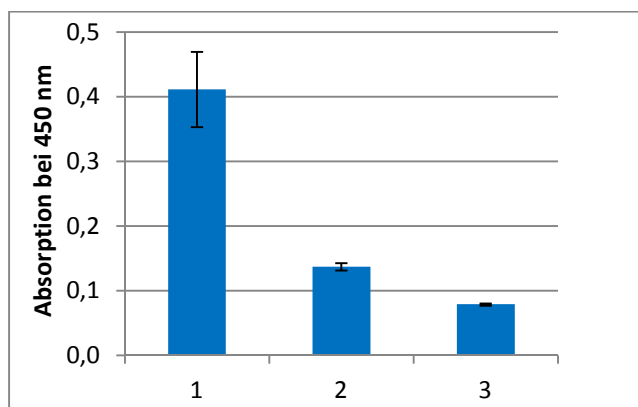


Abbildung 4.4.8.: Funktionalitätstest des gereinigten biotinylierten NH₂-Diketon-Derivats. Reihe 1: Aldolase AK 38C2 + Diketon; Reihe 2: Aldolase AK 38C2 – Diketon, Reihe 3: nur Diketon nach Zugabe von Blocklösung.

In Abbildung 4.4.8. Reihe 1 wurde das NH₂-Diketon-Derivat vom Aldolase-Antikörper gebunden und es konnte eine Absorption von ca. 0,4 gemessen werden. In Reihe 2, wo nur der Antikörper

(ohne Suizidsubstrat) vorlag wurde nur eine relative Absorption von ca. 0,1 detektiert. Bei Reihe 3 ist die relative Absorption noch geringer ($<0,1$), dort wurde nur das biotinylierte NH_2 -Diketon-Derivat nach Zugabe von Blocklösung inkubiert. Somit konnte die Funktionalität des biotinylierten und gereinigten NH_2 -Diketon-Derivats bestätigt werden.

Vor der Durchführung des Hefe-Screenings wurde das biotinylierte NH_2 -Diketon-Derivat des Suizidsubstrats erneut auf Funktionalität getestet. Dazu wurde der Aldolase-Antikörper 38C2 (Sigma-Aldrich) mit Hilfe von Na-Perjodat oxidiert und chemisch auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* EBY100 Zellen gekoppelt. Nach Zugabe des biotinylierten Diketons, sollte dieses über eine Schiffbase am Antikörper binden und anschließend mittels SPE im Durchfluss-Cytometer detektiert werden können (3.1.8.). In Abbildung 4.4.9. ist eine schematische Darstellung der Oberflächenmarkierung der Hefezellen abgebildet.

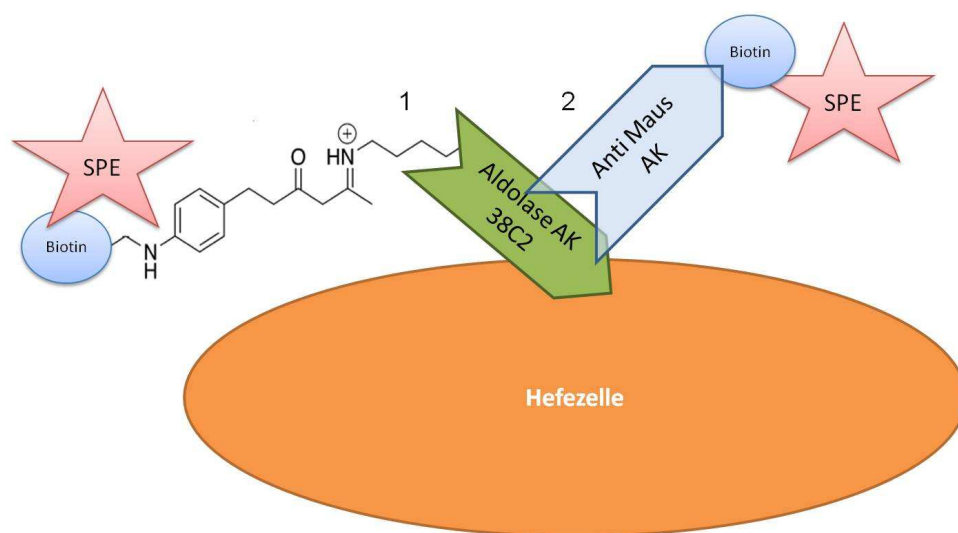


Abbildung 4.4.9.: Schema der Oberflächenmarkierung des Aldolase-Antikörpers 38C2 auf der Oberfläche von Hefezellen. 1: Markierung mit biotinyliertem Suizidsubstrat. 2: Markierung mit Anti-Maus Antikörper.

In Abbildung 4.4.10. sind die Ergebnisse der Messungen dargestellt.

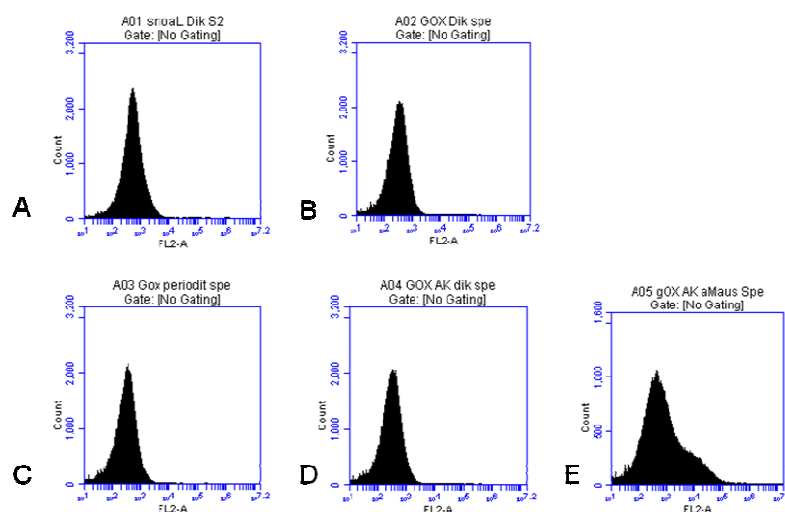


Abbildung 4.4.10.: Durchflusszytometrische-Messungen. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz von SPE (FL2) gegen die Anzahl der Ereignisse (Counts). A: EBY100 mit SnoaLwt auf der Oberfläche + Suizidsubstrat und SPE, B: EBY100 mit GOX auf der Oberfläche + Suizidsubstrat und SPE, C: EBY100 mit Na-Periodat inkubiert und GOX auf der Oberfläche + Suizidsubstrat und SPE, D: EBY100 mit Na-Periodat inkubiert und gekoppelten Aldolase AK 38C2 und GOX auf der Oberfläche + Suizidsubstrat und SPE, E: EBY100 mit Na-Periodat inkubiert und gekoppelten Aldolase AK 38C2 und GOX auf der Oberfläche ohne Suizidsubstrat mit anti-Maus-Biotin AK und SPE angefärbt.

Der Aldolase-Antikörper 38C2 wurde auf induzierte EBY100 Zellen gekoppelt, die eine Glucose-Oxidase (GOX) auf der Oberfläche präsentieren. Zur Kontrolle der Kopplung des Aldolase-Antikörpers auf der Zelloberfläche wurde ein biotinylierter Anti-Maus-Antikörper (Sigma-Aldrich) zu den Zellen gegeben und mit SPE angefärbt (3.1.8.) (Abbildung 4.4.10.E). Anhand der relativen Fluoreszenz-Verschiebung ist zu erkennen, dass der Aldolase-Antikörper auf der Oberfläche der EBY100 Zellen gekoppelt hat. In Abbildung 4.4.10.D ist die SPE-Färbung gezeigt, nachdem der auf der Zelloberfläche gebunden Aldolase-Antikörper mit dem biotinylierten Suizidsubstrat inkubiert wurde. Bei einer Bindung des Suizidsubstrats an den gekoppelten Antikörper würde man eine Verschiebung der relativen Fluoreszenz nach rechts erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall, somit konnte nicht gezeigt werden, dass das biotinylierte NH_2 -Diketon-Derivat auf der Oberfläche von Hefezellen detektiert werden kann. Daher wurde für die Screenings der Hefezellen die etwas größere biotinylierte Carboxy-Linkervariante eingesetzt. Zusätzlich wurde das NH_2 -Diketon-Derivat zu induzierten EBY100 Zellen gegeben, welche den SnoaL-Wildtyp präsentieren, um zu überprüfen, ob das Suizidsubstrat eventuell eine Bindung mit den zwei natürlichen Lysinresten auf der Oberfläche des Enzyms eingeht. In Abbildung 4.4.10.A ist zu erkennen, dass dies nicht der Fall ist. Die in den Abbildungen 4.4.10.B und 4.4.10.C dargestellten Kontrollen zeigen, dass das biotinylierte Suizidsubstrat auch nicht an der GOX und der Oberfläche von EBY100 Zellen bindet.

4.5. DURCHMUSTERUNG DER SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEKEN

4.5.1. DURCHMUSTERUNG DER LÖSLICHEN SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEK MIT HILFE EINES FLUORESCENZ-BASIERTEN ASSAYS

Für die Durchmusterung der löslichen SnoaL-Muteinbibliothek wurden 280 Einzelklone von Kulturplatten in drei *deep-well*-Platten wie unter 3.1.6. beschrieben überführt. Nach Aufreinigung der Proteine (Abschnitt 4.3.1.) wurden diese in dem fluoreszenzbasierten Aldolase-Assay mit dem Aldol-Sensor Methodol (List, 1998) eingesetzt. Die Durchführung des Assays erfolgte wie bei den einzelnen SnoaL-Lysinvarianten und ist in Abschnitt 4.2.2. beschrieben. In Abbildung 4.5.1. ist das Ergebnis der ELISA-Reader-Messung einer 96-*well* Platte mit den einzelnen SnoaL-Muteinen grafisch dargestellt.

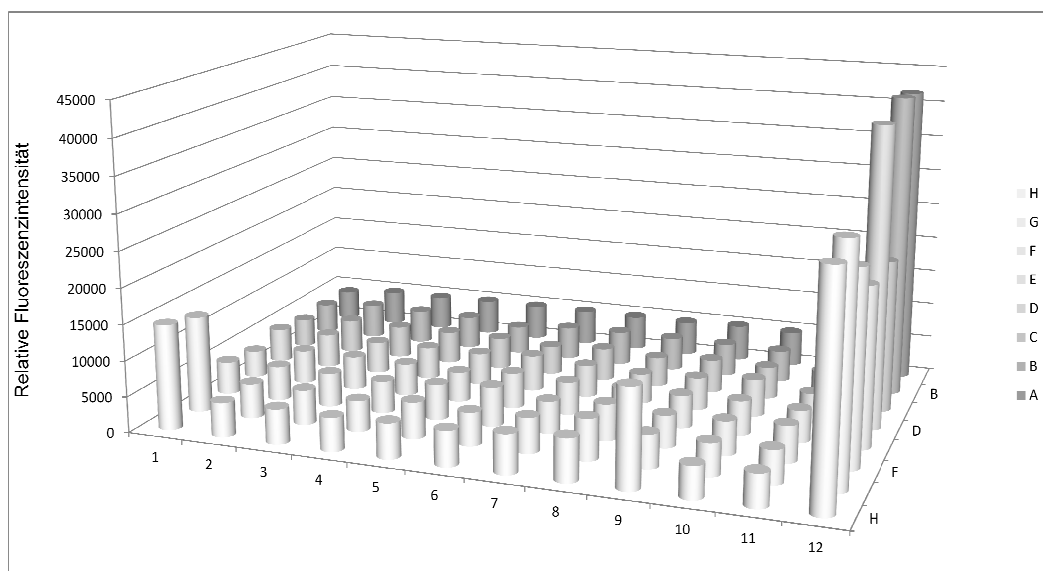


Abbildung 4.5.1.: ELISA-Reader Messung der löslichen SnoaL-Muteine nach *Retro*-Aldoltest. In Reihe 12 sind die positiven Kontrollen mit 6-Methoxy-2-naphthaldehyd dargestellt. In Reihe 1H und G, sowie in H9 ist 1 mM Lysin als Positiv-Kontrolle eingesetzt.

Wie in Abbildung 4.5.1. zu sehen ist, zeigen nur die Positiv-Kontrollen eine Zunahme in der relativen Fluoreszenzintensität. Als Kontrolle wurde in Reihe 12 das bei der *Retro*-Aldolreaktion entstehende Produkt 6-Methoxy-2-naphthaldehyd eingesetzt. In Reihe 1H und G, sowie in H9 ist 1 mM Lysin als Positiv-Kontrolle eingesetzt worden.

4.5.2. PHAGEDISPLAY-SCREENING DER SNOAL-PHAGENBIBLIOTHEK MIT IMMOBILISIERTEN SUIZID-SUBSTRAT

Die Durchmusterung der SnoaL-Muteine auf der Phagenoberfläche nach Bindern des Aldolase-Suizidsubstrats erfolgte wie in Methode 3.1.5. beschrieben. Das biotinylierte Diketon (4.4.2.) wurde an Streptavidin-beschichteten Magnet-beads (*Dynabeads*® M280 Streptavidin) immobilisiert, um so vermeintliche Substrat-bindende SnoaL-Varianten anzureichern und zu isolieren. Die Bindung an das Diketon ist eine kovalente Verknüpfung, da aktive Lysinreste über

eine Schiffbasenbildung mit dem Substrat reagieren. Aus diesem Grund konnten die Phagen nicht wie üblich über einen pH-*shift* von den Magnetkügelchen eluiert werden, da die kovalente Bindung auch bei pH 2,2 stabil ist. Daher wurde zwischen den Oberflächen-präsentierten SnoaL-Varianten und dem verkürzten pIII-Protein eine TEV-Protease-Schnittstelle eingebaut (Abbildung 4.5.2.).

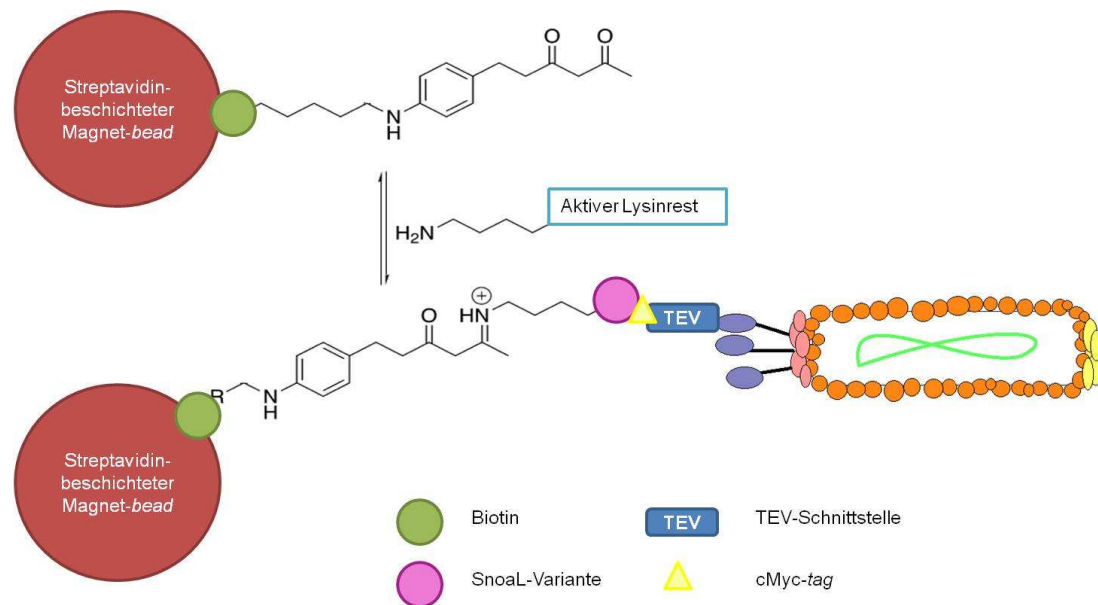


Abbildung 4.5.2.: Schematische Darstellung der Phagenbindung über eine Schiffbase an das Suizidsubstrat.

Die TEV-Protease spaltet spezifisch C-terminal nach dem Glutamin in der Erkennungssequenz E-N-L-Y-F-Q-G/S (Nunn, 2005). Die letzte Aminosäure der Erkennungssequenz kann ein Serin, oder ein Glycin sein (Parks, 1994; Phan, 2002).

Die Elution der Phagen erfolgte nach 30 min Inkubation des Ansatzes in 180 µl TEV-Puffer nach Zugabe von TEV-Protease. Der Überstand wurde anschließend in einem Magnetständer von den *beads* abgetrennt und zur Infektion von *E coli* ER2738-Zellen eingesetzt. Die infizierten Zellen wurden auf Agar-Platten ausgestrichen und kultiviert. Anschließend wurden aus den Zellen erneut Phagen für die nächste *Screening*-Runde produziert (3.1.3.). Bei einer Bindung der SnoaL-Muteine an das Suizidsubstrat wird eine Anreicherung positiver Varianten erwartet, was einen von Runde zu Runde steigenden Phagentiter zur Folge hat. Die Ergebnisse der jeweiligen Phagentiter der einzelnen Runden sind in Tabelle 4.5.1. dargestellt.

Tabelle 4.5.1. Phagentiter der einzelnen SnoaL *Screening*- Runden gegen das biotinylierte Suizidsubstrat. Die Titer wurden fotometrisch bestimmt.

| Screening Runden | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Titer der eingesetzten Phagen pro ml | 3x10 ¹¹ | 5x10 ¹¹ | 3x10 ¹¹ | 1x10 ¹¹ |
| Titer der eluierten Phagen pro ml | 5x10 ⁴ | 3x10 ⁵ | 7x10 ⁵ | 2x10 ⁵ |

Wie in Tabelle 4.5.1. zu erkennen ist, hat keine Anreicherung der Phagen nach vier *Screening*-Runden stattgefunden (Analyse der Einzelklone unter 4.5.2.1.). Deshalb wurde die Aktivität der TEV-Protease mit Hilfe eines Phagen-*blots* getestet (Abbildung 4.5.3.).

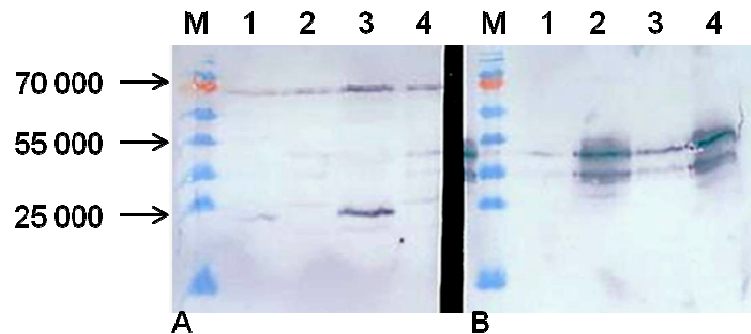


Abbildung 4.5.3.: Phagenblot der ersten zwei Runden der Snoal-Phagenbibliothek gegen das Suizidsubstrat. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder A: anti pIII-Blot. Spur 1: Snoal-Muteinbibliothek Runde 1 Tev-gespalten, Spur 2: Snoal-Muteinbibliothek Runde 1, Spur 3: Snoal-Muteinbibliothek Runde 2 TEV-gespalten, Spur 4: Snoal-Muteinbibliothek Runde 2. B: anti Myc-Blot. Spur 1: Snoal-Muteinbibliothek Runde 1 Tev-gespalten, Spur 2: Snoal-Muteinbibliothek Runde 1, Spur 3: Snoal-Muteinbibliothek Runde 2 TEV-gespalten, Spur 4: Snoal-Muteinbibliothek Runde 2.

Die Phagen der ersten beiden *Screening*-Runden wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches anschließend *geblottet* wurde. In Abbildung 4.5.3. ist das Ergebnis des Phagenblots dargestellt. In Abbildung 4.5.3.A ist der Western-Blot mit einem anti-pIII Antikörper inkubiert und über einen zweiten anti-Maus AP konjugierten Antikörper entwickelt wurden. In Spur 1 sind die Phagen aus der ersten *Screening*-Runde der Snoal-Muteinbibliothek nach Inkubation mit der TEV-Protease aufgetragen. Man kann eine Bande in der Höhe der roten Markerbande erkennen (70000), welche der Größe des Volllängen pIII-Proteins entspricht. Die zweite Bande in Spur 1 entspricht der zu erwartenden Größe des verkürzten pIII-Proteins, diese läuft erwartungsgemäß bei 25000. In Spur 3 (Abbildung 4.5.3.A) sind die gleichen Banden zu sehen, dort sind die Phagen der zweiten *Screening*-Runde der Snoal-Muteinbibliothek aufgetragen. In Spur 2 und 4 sind die jeweiligen Runden ohne Zugabe von TEV-Protease aufgetragen. Man erkennt keine Banden bei 25000. Die zu erwartende Bande des Snoal-pIII-Fusionsproteins ist auf einer Höhe von 35000 zu sehen (Vergleich Abbildung 4.2.5.). In Abbildung 4.5.3.B sind dieselben Phagen in der gleichen Reihenfolge wie in Abbildung 4.5.3.A aufgetragen, nur wurde der Blot mit einem anti-Myc Antikörper inkubiert. Die Entwicklung des *Blots* erfolgte, wie in Abschnitt 4.2.1. beschrieben. Man erkennt in den Spuren 2 und 4 zwei Banden in der Höhe von 40000 und 35000. Die zu erwartende Bande des Snoal-pIII-Fusionsproteins läuft auf einer Höhe von 35000, wie auch in Abbildung 4.2.3. zu sehen ist. In den Spuren 1 und 3 sind diese Banden ebenfalls, wenn auch etwas schwächer zu erkennen. Bei einer vollständigen Spaltung durch die TEV-Protease würde man eine Bande in der Höhe von 25000 erwarten. Dort sollte das solitäre Snoal-Protein laufen, welches nach Verdau mit der Protease das Myc-tag behält.

Diese Daten zeigen, dass die TEV-Protease aktiv ist, daher wurde eine andere Möglichkeit gesucht potenzielle Substrat-Binder anzureichern. Die alternative Strategie bestand darin, eine andere Elutions-Methode der gebundenen Phagen zu testen. Außerdem wurde eine neue Charge des 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dion biotinyliert und HPLC-gereinigt (Abbildung 4.4.2.).

Um eine Anreicherung unspezifisch gebundener Phagen zu vermeiden, wurden diese zunächst mittels pH-shift von den Magnet-beads eluiert. Die Konjugationsprodukte der Schiffbasen-aktiven Lysinreste können dadurch nicht abgelöst werden. Die beads wurden mit dem Suizidsubstrat und den vermeintlich gebundenen Phagen für 8 min mit 90 µl 0,2 mM Glycin/HCl, pH 2,2 inkubiert. Anschließend wurden die Magnetkügelchen im Magnetständer pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die beads fünfmal mit PBS gewaschen und danach direkt zur Infektion der *E coli* ER2738 Zellen eingesetzt. Die weitere Amplifikation der Phagen erfolgte wie vorher beschrieben. Es wurden insgesamt dreimal vier Runden mit dieser Elutions-Methode durchgeführt. Die Ergebnisse der Phagentiter sind in Tabelle 4.5.2. dargestellt.

Tabelle 4.5.2.: Phagentiter der einzelnen *SnoaL Screening*-Runden gegen das biotinylierte Suizidsubstrat nach Infektion der *E coli* ER2738 Zellen mit den Magnetkügelchen. Die Titer wurden Photometrisch bestimmt.

| Screening Runden | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|--|--|--|--|
| Titer der eingesetzten Phagen pro ml | 3×10^{11} 3×10^{11} 3×10^{11} | 3×10^{11} 2×10^{11} 2×10^{11} | 9×10^{10} 3×10^{10} 5×10^{10} | 1×10^{10} 2×10^{10} 3×10^{10} |
| Titer der eluierten Phagen pro ml | 1×10^4 2×10^4 5×10^4 | 3×10^4 2×10^5 6×10^4 | 3×10^5 1×10^5 4×10^5 | 5×10^5 2×10^5 3×10^5 |

Wie man anhand der Tabelle 4.5.2. erkennen kann, ist der Elutionstiter der Phagen in der ersten Runde sehr gering. In Runde 3 nimmt der Titer der eluierten Phagen zunächst zu, bleibt dann aber bis zu Runde 4 annähernd gleich. Das heißt, dass auch bei dieser Elutions-Methode kaum eine Anreicherung der Phagen erfolgte. Eine Analyse von Einzelklonen ist in Abschnitt 4.5.2.1. beschrieben.

Um zu kontrollieren, ob das Plasmid pAKds-MT, welches die *SnoaL* Muteingene trägt, bei der Amplifikation der Phagen eventuell defizitär ist, wurde von zufällig ausgewählten Einzelklonen aus der dritten Runde des Phagen-Screenings eine Kolonie-PCR durchgeführt. Als *Primer* wurden *M13 rev up* und *pIII-Clal lo* verwendet. Diese hybridisieren auf dem pAKds-MT Vektor und müssen bei Vorhandensein des Plasmids ein PCR-Produkt liefern. Die PCR-Produkte wurden zur Analyse auf ein Agarose-Gel aufgetragen (Abbildung 4.5.4.).

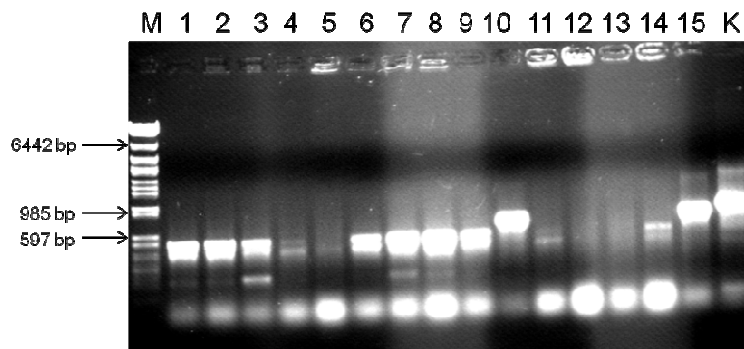


Abbildung 4.5.4.: Kolonie-PCR ausgewählter Einzelklone der SnoaL-Muteinbibliothek nach Runde 3. Spur 1-15: PCR-Produkte der SnoaL-Einzelklone aus Runde 3; K: PCR-Produkt des pAKds-MT-SnoaLwt

Bei der Auswertung des Agarose-Gels wurde festgestellt, dass die amplifizierten Gene nicht der erwarteten Größe von 976 bp entsprachen. Als Kontrolle wurde das SnoaL-pIII-Fusionsgen aus dem pAKds-MT-SnoaLwt Vektor mit amplifiziert (Abbildung 4.5.4.K). Man erkennt in Abbildung 4.5.4., dass alle anderen PCR-Produkte kleiner sind und unterhalb der Kontrollbande verlaufen. Es ist davon auszugehen, dass bei der Amplifikation der Phagenrunden ein Teil des Fusionsgens der SnoaL-Varianten und dem pIII-Gen deletiert wurde und diese Varianten sich durchgesetzt haben.

4.5.2.1. IDENTIFIZIERUNG POTENZIELLER EINZELKLONE

Um zu überprüfen, ob trotz Teilverlust des SnoaL-pIII-Fusionsgens bei einem Teil der angereicherten Phagen aktive Lysin-Varianten aus der SnoaL-Muteinbibliothek isoliert werden konnten, wurde jeweils von den Runden 3 und 4 aus allen drei *Screenings* der *Retro*-Aldoltest mit Einzelklon-Phagen durchgeführt (4.2.2.). Dazu wurden für jedes *Screening* 96 Einzelklone aus Runde 3 und 4 in 1,5 ml dYT-Medium in *deep-well*-Platten angezogen. Bei leichter Trübung der einzelnen Vertiefungen wurde eine entsprechende Menge an Helferphagen hinzugefügt. Die Phagenproduktion erfolgte, wie in Methode 3.1.3. beschrieben, nur in einem entsprechenden Volumen der *deep-well*-Platten. Nach der Produktion der Phagen wurden die Zellen zentrifugiert (Plattenzentrifuge, 3700 rpm, 12 min) und 100 µl des Überstands in eine ELISA-Platte pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 50 µM Methodol pro Vertiefung und eine Inkubation des Reaktionsansatzes über Nacht. Daraufhin erfolgte die Vermessung der Platten im ELISA-Reader. Die Durchführung der Messung erfolgte, wie unter 3.3.6. beschrieben. In Abbildung 4.5.5. ist das Ergebnis der Messung grafisch dargestellt. Als Positiv-Kontrolle diente 50 µM des Reaktionsprodukts 6-Methoxy-2-naphthaldehyd in PBS (Abbildung 4.5.5. Reihe 12 G und H). Außer bei der Positiv-Kontrolle, konnte bei keinem Phagenklon Fluoreszenz im ELISA-Reader detektiert werden (Abbildung 4.5.5.).

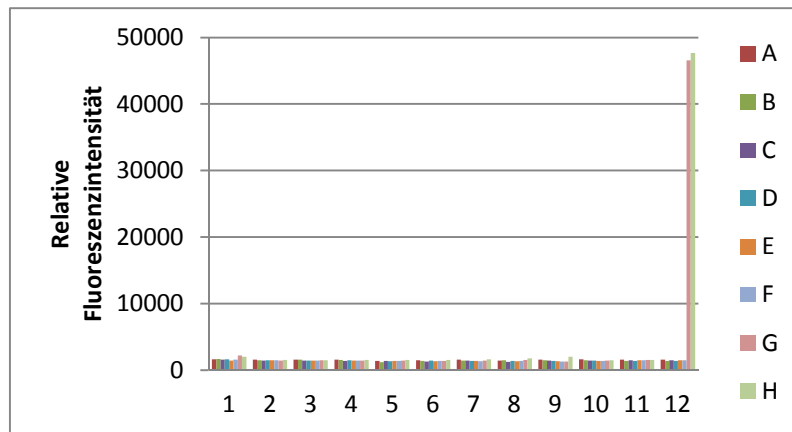


Abbildung 4.5.5.: *Retro*-Aldoltest mit Einzelklon-Phagen von den Runden 3 und 4 aus allen drei *Screenings* der SnoaL-Muteinbibliothek gegen das Suizidsubstrat. Excitations-Wellenlänge: 360 nm, Emissions-Wellenlänge: 465 nm.

Da keine positiven Klone detektiert werden konnten, wurden zusätzlich *Phage*-ELISA in Streptavidin-beschichteten Platten und in *Maxi-Sorp*-Platten von den *Screening*-Runden 3 und 4 durchgeführt. Bei den Streptavidin-beschichteten Mikrotiter Platten wurde das biotinylierte Suizidsubstrat durch die Bindung von Biotin an Streptavidin immobilisiert und anschließend die Einzelklonphagen dazugegeben (3.1.7.1.). Die Detektion der Phagen erfolgte über Antikörperbindung an das pVIII-Hüllprotein der Phagen und eine anschließende Peroxidase-vermittelte Reaktion lieferte ein Signal für den ELISA-Reader (Abbildung 4.5.6.). Als Positiv-Kontrolle wurde biotinylierter anti-Maus Antikörper an Streptavidin gebunden und anschließend der Aldolase Antikörper 38C2 hinzugefügt (Abbildung 4.5.6. Reihe 10 A, B und c). Als Negativ Kontrolle wurden Phagen eingesetzt, die den SnoaLwt auf ihrer Oberfläche präsentierten (Abbildung 4.5.6. Reihe 10 D, E und F).

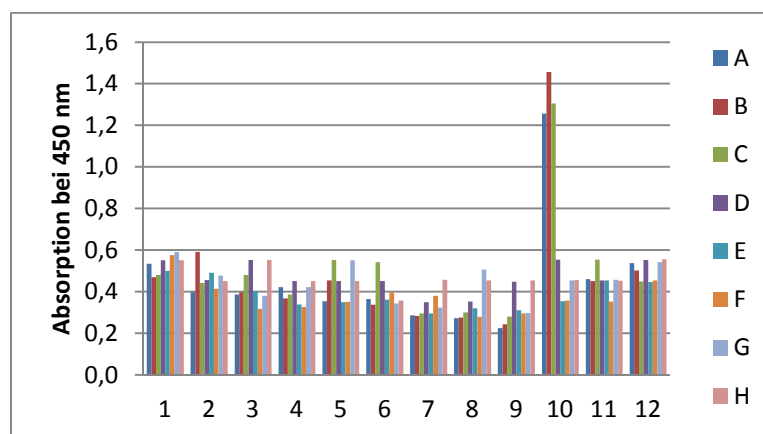


Abbildung 4.5.6.: *Retro*-Aldoltest in Streptavidin-beschichteten Mikrotiter Platten mit Einzelklon-Phagen von den Runden 3 und 4 aus allen drei *Screenings* der SnoaL-Muteinbibliothek gegen das Suizidsubstrat.

Auch bei dem Einzelklon-*Screening* in der *Maxi-Sorp*-Platte konnte kein positives Signal detektiert werden. Bei diesem *Screening*-Verfahren wurden die Phagen aufgrund von Sorption an der Mikrotiterplatte immobilisiert und das biotinylierte Suizidsubstrat wurde anschließend

dazugegeben (3.1.7.2.). Über ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat sollten vermeintlich positive SnoaL-Varianten im ELISA-Reader auf Grund eines Farbsignals bei 450 nm sichtbar gemacht werden (Abbildung 4.5.7.).

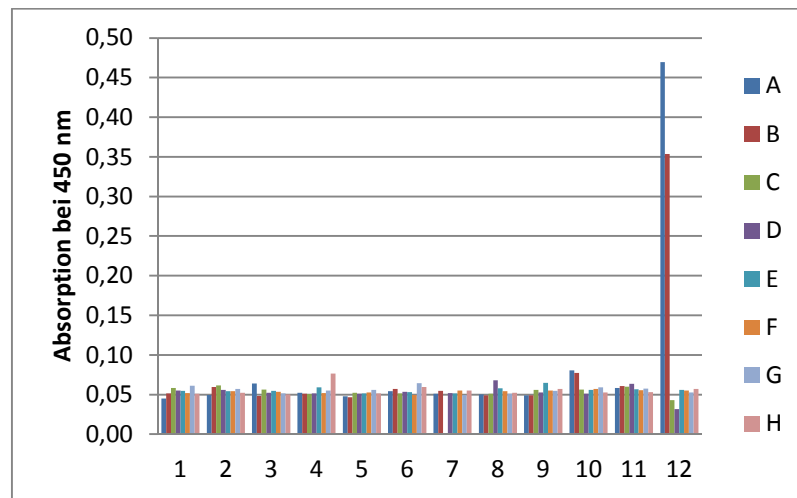


Abbildung 4.5.7.: Retro-Aldoltest in Nunc Maxi-Sorp Platten mit Einzelklon-Phagen von den Runden 3 und 4 aus allen drei Screenings der SnoaL-Muteinbibliothek gegen das Suizidsubstrat.

In Abbildung 4.5.7. Reihe 12 A und B wurde als Positiv-Kontrolle der Aldolase-Antikörper 38C2 immobilisiert. In Reihe 12 C-E wurden Phagen, die das SnoaLwt-Enzym präsentieren als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

4.5.3. DURCHMUSTERUNG DER SNOAL-S. CEREVISIAE MUTEINBIBLIOTHEK AM FACS

Auf der Suche nach aktiven Lysinvarianten der Aldolase-Scaffolds der SnoaL-Muteinbibliothek II, wurden die Hefezellen am FACS durchmustert. Hierfür wurden die einzelnen Unterbibliotheken zunächst getrennt voneinander in 500 ml SD-Medium angezogen und wiederum getrennt voneinander in 500 ml SG-PEG-Medium zur Induktion überführt (3.1.2.). Da nur induzierte Hefezellen die SnoaL-Varianten auf der Oberfläche präsentieren, musste zunächst anhand einer Immunfluoreszenz-Färbung die Induktion überprüft werden. Dazu wurde eine Markierung des cMyc-Epitops vorgenommen (3.1.8.). Die Detektion der Markierung erfolgte über das Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat am FACS. In Abbildung 4.5.5. sind die einzelnen Myc-Färbungen der SnoaL-Muteinbibliothek 2aII, 2bIII und 2cII gezeigt.

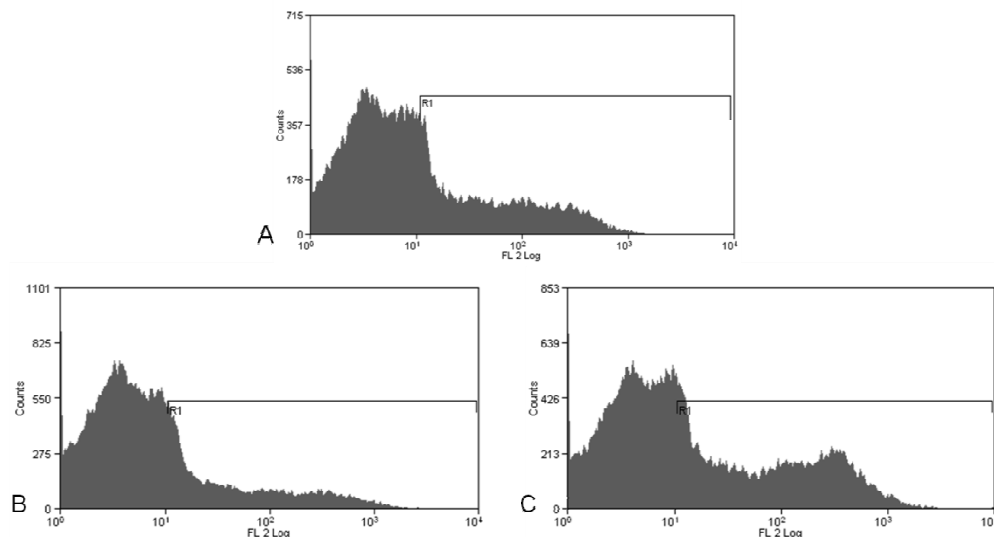


Abbildung 4.5.5.: Histogramme der FACS-Messungen der Myc-Färbungen der SnoaL-Muteinbibliothek II. A: 2all; B: 2bIII und C: 2cII. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz der myc-Epitop-Markierung (FL2) gegen die Anzahl der Ereignisse (Counts).

Das Ergebnis der FACS-Analyse zeigt, dass 20-50 % der Zellen eine positive Myc-Epitop-Markierung aufweisen. Dies war ausreichend für eine repräsentative Anzahl an Oberflächen-exponierter SnoaL-Varianten. Somit wurden die Hefezellen der einzelnen Unterbibliotheken zentrifugiert, um jeweils eine Zellzahl von ca. 10^9 einsetzen zu können. Für die Markierung mit dem biotinylierten Suizidsubstrat, wurden die einzelnen Unterbibliotheken vereinigt und wie in Methode 3.1.9. für die FACS-Sortierung vorbereitet. Die Sortierung am FACS erfolgte unter folgenden Einstellungen: der FCS wurde auf 650 eingestellt und die rote Fluoreszenz (FL2) und grüne Fluoreszenz (FL1) auf 600. Die gesamten Messungen wurden mit der Software *Summit 4.0* bzw. *CFlow®* aufgezeichnet (3.1.10.). Bei der ersten Sortierungs-Runde der SnoaL-Muteinbibliothek gegen das Suizidsubstrat (SnoaL-sort 1) wurden insgesamt $2,5 \times 10^7$ Zellen im FACS vermessen und davon konnten $1,05 \times 10^5$ Zellen ausgesondert werden, was einem Anteil von 1,13 % entspricht. Das Sortierungs-Fenster (R1) wurde dabei so gewählt, dass nur Zellen ab einer relativen Fluoreszenz von über 10 aussortiert wurden. Die aussortierten Zellen wurden anschließend direkt wieder in das Durchflusszytomer gehalten und erneut einer Sortierung unterzogen. Bei dieser Resortierung (SnoaL-resort 1) wurde das Fenster noch stringenter gewählt, um nach Möglichkeit die besten Binder zu isolieren. In Abbildung 4.5.6. ist die Sortierung (A) und Resortierung (B) der ersten Screening-Runde der SnoaL-Muteinbibliothek gegen das Suizidsubstrat gezeigt.

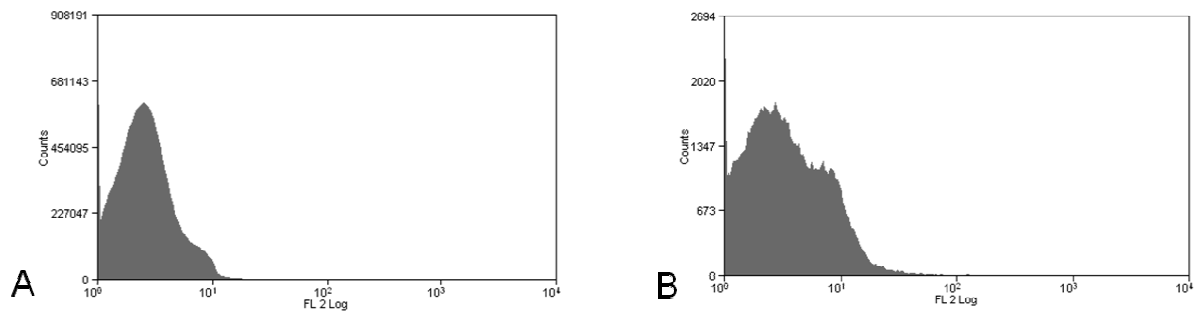


Abbildung 4.5.6. Histogramm der Sortierung (A) und Resortierung (B) der ersten Screening-Runde der SnoaL-Muteinbibliothek gegen das Suizidsubstrat. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz (FL2) gegen die Anzahl der Ereignisse (Counts).

Der SnoaL-resort 1 umfasste insgesamt 1×10^5 Zellen, von denen insgesamt 8779 Zellen (9,02 %) aussortiert wurden.

Die ausgemusterten Zellen wurden mit SD-Medium auf ein Volumen von 2 ml gebracht und davon wurde eine 10^{-3} Verdünnungsplatte erstellt. Die restlichen Zellen wurden in 200 ml SD-Medium angezogen und nach erfolgreicher Kultivierung in *freezing-solution* bei -80°C gelagert. Die Auszählung der Platte ergab eine Klonanzahl von 7 auf der 10^{-3} Verdünnungsplatte. Somit konnten ca. 7000 Zellen in der ersten *Screening*-Runde isoliert werden.

Für eine zweite Sortierungsrunde (SnoaL-sort 2) wurden die aus Runde 1 isolierten Zellen erneut in SD-Medium angezogen und anschließend für zwei Tage bei 20°C induziert. Für den Nachweis der Induktion wurde wieder eine Markierung des cMyc-Epitops vorgenommen (Abbildung 4.5.7.A). Für die Bindung an das Suizidsubstrat wurden diesmal nur ca. 5×10^7 Zellen eingesetzt und bei den gleichen Einstellungen wie in der ersten *Screening*-Runde am FACS vermessen. Abbildung 4.5.7.B zeigt die zweite Sortierung der SnoaL-Muteinbibliothek gegen das Suizidsubstrat (SnoaL-sort 2). Die im Anschluss darauf durchgeführte Resortierung (SnoaL-resort 2) ist in Abbildung 4.5.7.C dargestellt.

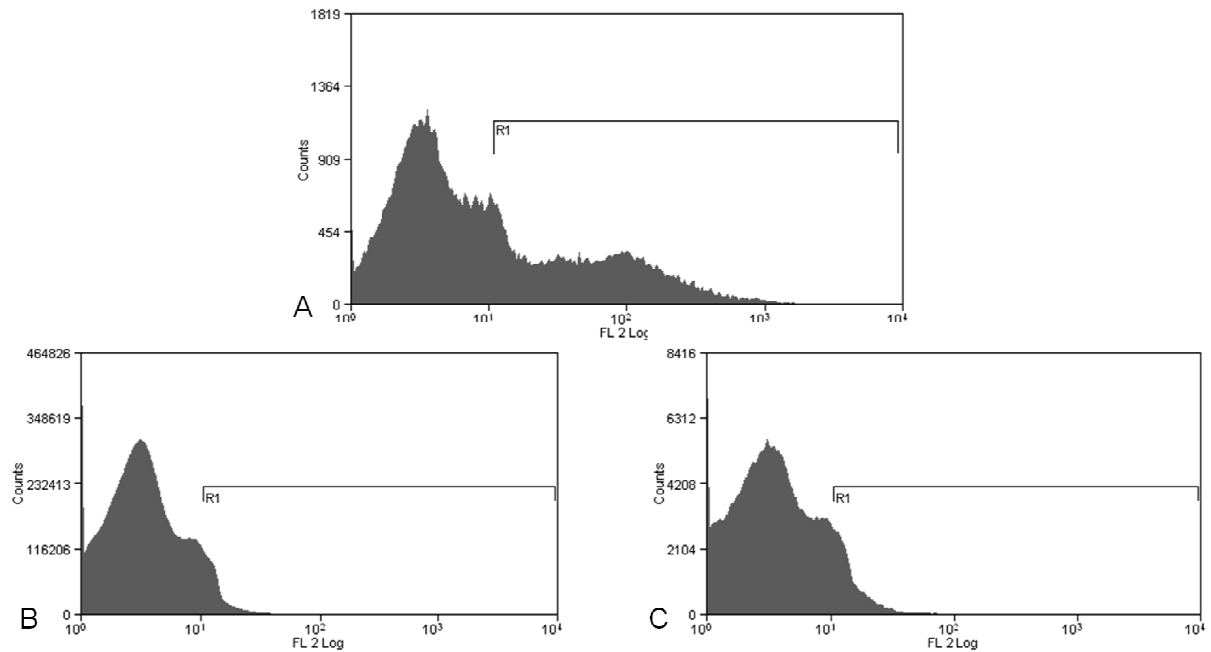


Abbildung 4.5.7. Histogramm der Myc-Färbung (A) Sortierung (B) und Resortierung (C) der zweiten *Screening*-Runde der *SnoaL*-Muteinbibliothek gegen das Suizidsubstrat. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz (FL2) gegen die Anzahl der Ereignisse (Counts).

Wie auch bei der ersten Sortierung wurde das Sortierfenster so gelegt, dass Zellen mit einer relativen Fluoreszenz größer 10 aussortiert wurden. Insgesamt wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen sortiert, von denen 1×10^5 (1,64 %) Zellen aussortiert wurden. Für eine Resortierung wurde das Sortierungsfenster wiederum etwas stringenter gewählt und von den 3×10^5 durchmusterten Zellen 7475 (3,78 %) aussortiert. Anhand der Verdünnungsplattierung konnte ermittelt werden, dass ca. 5000 potenzielle Aldolase-*Scaffolds* ausgemustert werden konnten. Diese wurden wiederum nach Kultivierung in SD-Medium zentrifugiert und in *freezing-solution* bei -80 °C gelagert.

4.5.3.1. IDENTIFIZIERUNG POTENZIELLER EINZELKLONE

Aus der zweiten *Screening*-Runde der *SnoaL*-Muteinbibliothek gegen das Suizidsubstrat wurden 50 einzelne Hefekolonien mittels PCR auf das Vorhandensein des *snoaL*-Gens hin überprüft. Zum Amplifizieren des Inserts wurden die Primer *pCT-OL Sfi up* und *-lo* verwendet. 30 der positiv getesteten Klone wurden daraufhin in 5 ml SD-Medium in Kulturröhrchen angezogen. Nach eintägiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in SG-PEG-Medium in kleine Petrischalen überführt (3.1.2.). Die Induktions-Analyse der einzelnen Hefeklone mittels Myc-Färbung (3.1.8.) ist exemplarisch an 4 Beispielen in Abbildung 4.5.8 dargestellt. Ebenfalls in Abbildung 4.5.8. dargestellt sind die FACS-Analysen der jeweiligen Einzelklone nach Markierung mit dem Suizidsubstrat.

Wie in Abbildung 4.5.8. zu erkennen ist, konnte keine positive Myc-Färbung nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass die analysierten SnoaL-Varianten nicht vollständig auf der Oberfläche der Hefezellen präsentiert wurden. Daher konnte auch bei allen 30 Einzelklonen keine Bindung an das Suizidsubstrat festgestellt werden.

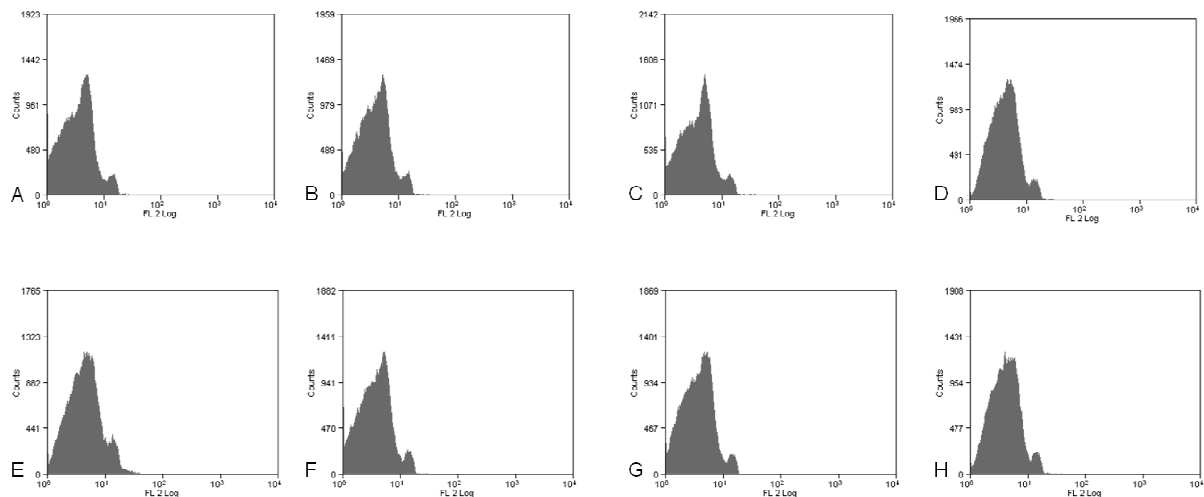


Abbildung 4.5.8.: Histogramme der FACS Messung der getesteten SnoaL Einzelklone aus der zweiten Sortierungsrunde. A: SnoaL Klon 1 Myc-Markierung; B: SnoaL Klon 1 mit Diketon markiert; C: SnoaL Klon 2 Myc-Markierung; D: SnoaL Klon 2 mit Diketon markiert; E: SnoaL Klon 3 Myc-Markierung; F: SnoaL Klon 3 mit Diketon markiert; G: SnoaL Klon 4 Myc-Markierung; H: SnoaL Klon 4 mit Diketon markiert. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz (FL2) gegen die Anzahl der Ereignisse (Counts).

4.6. DURCHMUSTERUNG VON VHH-ANTIKÖRPER BIBLIOTHEKEN MIT DEM SUIZID-SUBSTRAT AUF DER SUCHE NACH KATALYTISCHEN ALDOLASE-ANTIKÖRPERN

Im vorhergegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass es nicht möglich war mittels *Yeast-Display* aktive SnoaL-Varianten zu isolieren. Daher wurde versucht mit Hilfe des Suizidsubstrats katalytische Antikörper aus cameliden VHH-Bibliotheken mittels *Phage-* und *Yeast-Display* zu gewinnen (1.5.).

Für das *Phage-Display* standen eine synthetisch generierte und eine naive Antikörperbibliothek zur Verfügung. Bei der Durchmusterung mittels FACS kam eine naive VHH-Bibliothek auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* zum Einsatz.

4.6.1. PHAGE-DISPLAY-SCREENING MIT SYNTHETISCHER UND NAIVER VHH-BIBLIOTHEK

Das Phagen-Screening der Antikörperbibliotheken gegen das Suizidsubstrat erfolgte wie bei den SnoaL-Varianten (4.5.2.). Zur Elution der Phagen wurde die Methode gewählt, bei der die *beads* zur Infektion der *E. coli* ER2738 Zellen eingesetzt werden, nachdem zuvor die unspezifisch gebundenen Phagen mittels *pH-shift* entfernt wurden (3.1.5.). Dies war notwendig, da bei der synthetischen VHH-Bibliothek sich keine TEV-Protease-Schnittstelle auf dem Plasmid befindet. Mit beiden Bibliotheken wurden je dreimal vier Runden durchgeführt. Die Ergebnisse der Phagentiter sind in Tabelle 4.6.1. dargestellt.

Tabelle 4.6.1. Phagentiter der einzelnen drei VHH *Screening*-Runden gegen das biotinylierte Suizidsubstrat nach Infektion der *E. coli* ER2738 Zellen mit den Magnetkugeln. Die Titer wurden fotometrisch bestimmt.

| <i>Screening</i> Runden | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| Titer der eingesetzten Phagen pro ml | 3×10^{11} | 3×10^{11} | 9×10^9 | 1×10^9 |
| Titer der eluierten Phagen pro ml | 1×10^4 | 3×10^4 | 3×10^5 | 5×10^5 |

Bei dem Phagen-*Screening* mit den VHH-Bibliotheken konnten zunächst vermeintlich positive Substratbinder angereichert werden. Was man anhand der annähernd steigenden Phagentiter (Tabelle 4.6.1.) erschließen kann.

Um die Präsentation der Antikörper-Varianten auf der Phagenoberfläche zu überprüfen, wurde das pIII-Protein der Phagen mittels Immunodetektion im Western-*blot* nachgewiesen (4.5.2.). Die Entwicklung erfolgte durch eine Alkalische-Phosphatase Reaktion (Abbildung 4.6.1.).

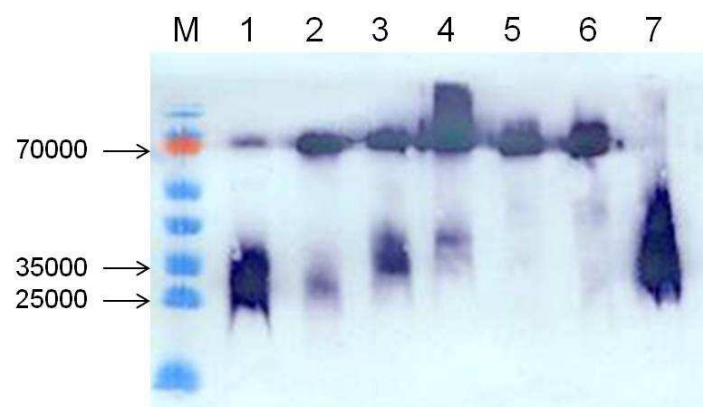


Abbildung 4.6.1.: Phagenblot der synthetischen VHH-Bibliothek (Spur 1) und die vier *Screening*-Runden gegen das Suizidsubstrat. Spur 2: Runde 1; Spur 3: Runde 2; Spur 4: Runde 3; Spur 5: Runde 4 .M: PageRulerTM Prestained Protein Ladder. Spur 6: vierte *Screening*-Runde der naiven VHH-Bibliothek gegen das Suizidsubstrat. Spur 7: Phagen mit oberflächenexponierter Superoxid-Dismutase (SOD) als positiv Kontrolle.

In der ersten Spur sind die Phagen der synthetischen VHH-Bibliothek vor dem *Screening* gegen das Suizidsubstrat aufgetragen. In Spur 2-5 sind die Phagen der *Screening*-Runden 1-4 aufgetragen. In Spur 6 wurden die Phagen der vierten Runde gegen das Suizidsubstrat der naiven VHH-Bibliothek *geblottet*. Spur 7 zeigt eine positiv-Kontrolle für das pIII-Ptotein. Wie erwartet ist in Spur 1-6 eine Bande in Höhe von 70000 zu erkennen. Dies entspricht der Laufhöhe des Volllängen-pIII-Proteins (MW=42609), welches auf jeder Phagenoberfläche präsentiert wird (siehe auch Abbildung 4.2.5.). Das VHH-pIII-Fusionsprotein sollte mit einem Molekulargewicht von 31964 in einer Höhe von ca. 30000 laufen. Man erkennt in Spur 1 bei der synthetischen Phagenbibliothek eine signifikante Bande in der entsprechenden Größe. Nach der ersten *Screening*-Runde (Spur 2) kann diese Bande ebenfalls detektiert werden. In Runde 2 und

3 (Spur 3 und 4) verläuft die Bande des Fusionsproteins bei 35000 und 40000. Nach der vierten *Screening*-Runde konnte weder bei der synthetischen VHH-Bibliothek (Spur 5), noch bei der naiven VHH-Bibliothek (Spur 6) das pIII-Fusionsprotein detektiert werden.

4.6.1.1. IDENTIFIZIERUNG POTENZIELLER EINZELKLONE

Für die Identifizierung vermeintlich positiver katalytischer Aldolase-Antikörper, wurden Einzelklone aus den dritten *Screening*-Runden getestet. Wie bei der SnoaL-Phagenbibliothek (4.5.2.1.) wurden jeweils 96 Einzelklone in *deep-well*-Platten angezogen und Phagen produziert. Es folgten der *Retro*-Aldoltest mit Methodol (3.1.6.) (Abbildung 4.6.2.), sowie die Phage-ELISAs in *Maxisorp* und Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten (3.1.7.) (Daten nicht gezeigt). Es konnte jedoch kein katalytischer Aldolase-Antikörper aus den beiden Phagenbibliotheken isoliert werden.

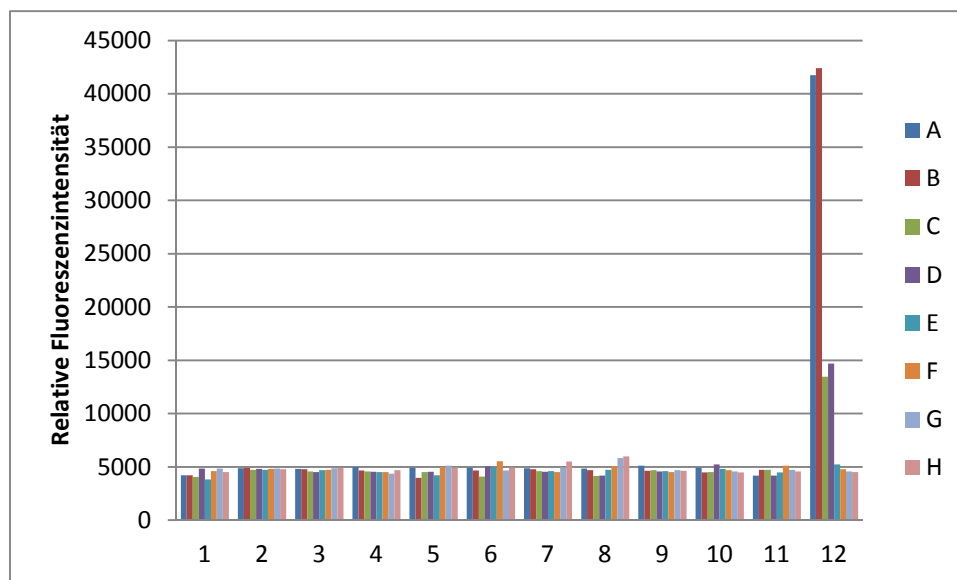


Abbildung 4.6.2.: Daten der ELISA-Reader Messung der VHH-Phagen aus den dritten *Screening*-Runden gegen das Suizid-Substrat im *Retro*-Aldoltest mit Methodol. Reihe 12 A und B: MONAL; Reihe 12 C und D: Aldolase-Antikörper 38C2; Reihe 12 E-H: SnoaL wt.

4.6.2. DURCHMUSTERUNG EINER NAIVEN VHH-*S. CEREVISIAE* BIBLIOTHEK AM FACS

Da mittels *Phage-Display* kein katalytischer Aldolase-Antikörper isoliert werden konnte (4.6.1.1.), erfolgte die Durchmusterung einer naiven cameliden VHH-*S. cerevisiae* Bibliothek (1.5.2.) am FACS. Analog zu der SnoaL-Muteinbibliothek II wurden zwei *Screening*-Runden gegen das Suizids substrat am FACS durchgeführt und anschließend Einzelklone auf die Substrat-Bindung analysiert.

Zunächst wurden die Hefezellen in 2 l SD-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 9 angezogen und anschließend nach Zentrifugation und zweimaligen Waschen mit PBS in 1 l SG-PEG-Medium überführt. Die Zellen wurden für zwei Tage bei 25 °C in einem Kolben ohne Schütteln inkubiert. Die Analyse der Induktion erfolgte anhand einer Markierung der cMyc-Epitops (3.1.8.) und

wurde im FACS detektiert. Abbildung 4.6.3.A zeigt die Präsentation des cMyc-Epitops auf der Oberfläche der Hefezellen der VHH-Bibliothek detektiert mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Färbung.

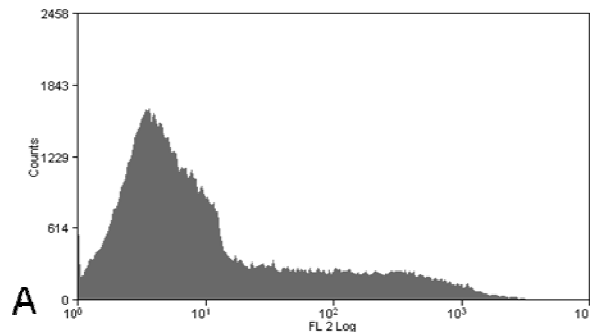


Abbildung 4.6.3.A: Histogramme der FACS-Messungen der Myc-Färbungen der VHH-Hefebibliothek. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz (FL2) gegen die Anzahl der Ereignisse (Counts).

Anhand der FACS-Daten lässt sich erkennen, dass ca. 20 % der Hefezellen induziert sind und somit die VHHs auf der Oberfläche präsentieren. Für die Markierung mit dem biotinylierten Suizidsubstrat wurden ca. 5×10^9 Zellen zentrifugiert und nach Methode 3.1.9. für die FACS-Sortierung vorbereitet. Die Einstellungen für die Sortierungen am FACS waren dieselben, wie bei der SnoaL-Muteinbibliothek II. In der ersten Runde der VHH-Bibliothek gegen das Suizidsubstrat (VHH-sort 1) wurden insgesamt $4,3 \times 10^7$ Zellen im FACS vermessen. Davon wurden $3,3 \times 10^5$ Zellen aussortiert. Dies entspricht einem Anteil von 1,6 %. Das Sortierungs-Fenster wurde dabei, wie auch bei der ersten Runde der SnoaL Hefe-Bibliothek, so gewählt, dass nur Zellen ab einer relativen Fluoreszenz von über 10 ausgemustert wurden. Anschließend erfolgte eine Resortierung der ausgesonderten Zellen (VHH-resort 1), dabei wurde das Sortierungs-Fenster etwas stringenter gewählt, so dass Zellen ab einer relativen Fluoreszenz ab 50 isoliert werden konnten. Der VHH-resort 1 umfasste insgesamt $3,9 \times 10^5$ Zellen, von denen insgesamt $3,5 \times 10^4$ Zellen (10,6 %) aussortiert wurden. In Abbildung 4.6.4. sind die FACS-Bilder der Sortierung und Resortierung der ersten Screening-Runde der VHH-Bibliothek gegen das Suizidsubstrat gezeigt.

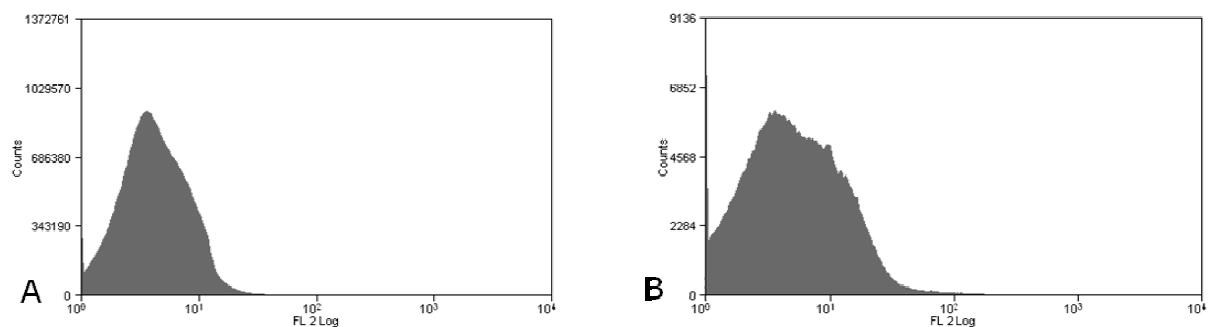


Abbildung 4.6.4.: Histogramm der Sortierung (A) und Resortierung (B) der ersten Screening-Runde der VHH-Bibliothek gegen das Suizidsubstrat. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz (FL2) gegen die Anzahl der Ereignisse (Counts).

In Abbildung 4.6.4. ist zu erkennen, dass zwischen der Sortierung und Resortierung 1 die prozentuale Anzahl der Zellen mit einer relativen Fluoreszenz von 10 gestiegen ist.

Nach der Resortierung wurden die ausgesonderten Zellen mit SD-Medium auf ein Volumen von 2 ml gebracht, davon eine 10^{-3} Verdünnung auf einer SD-Kulturplatte ausgestrichen. Die restlichen Zellen wurden in 200 ml SD-Medium angezogen und nach erfolgreicher Kultivierung in *freezing-solution* bei -80°C gelagert. Die Auszählung der Kolonien auf der Kulturplatte ergab eine Klonanzahl von 28 auf der 10^{-3} Verdünnungsplatte. Somit konnten ca. 28000 Zellen in der ersten *Screening*-Runde isoliert werden.

Die aus Runde 1 isolierten Zellen wurden für eine zweite *Screening*-Runde (VHH-sort 2) in 200 ml SD-Medium angezogen und anschließend für zwei Tage in SG-PEG-Medium in einer großen Petrischale bei 20°C induziert. Die Induktion wurde erneut über die Markierung des cMyc-Epitops analysiert (Abbildung 4.6.5.A). Es konnten 70 % der Zellen positiv getestet werden. Für die Markierung mit dem Suizidsubstrat wurden ca. 3×10^7 Hefezellen eingesetzt und bei den gleichen Einstellungen wie der ersten *Screening*-Runde am FACS vermessen. Abbildung 4.6.5.B zeigt die zweite Sortierung der VHH-Bibliothek gegen das Suizidsubstrat (VHH-sort 2). Die im Anschluss darauf durchgeführte Resortierung (VHH-resort 2) ist in Abbildung 4.6.5.C dargestellt.

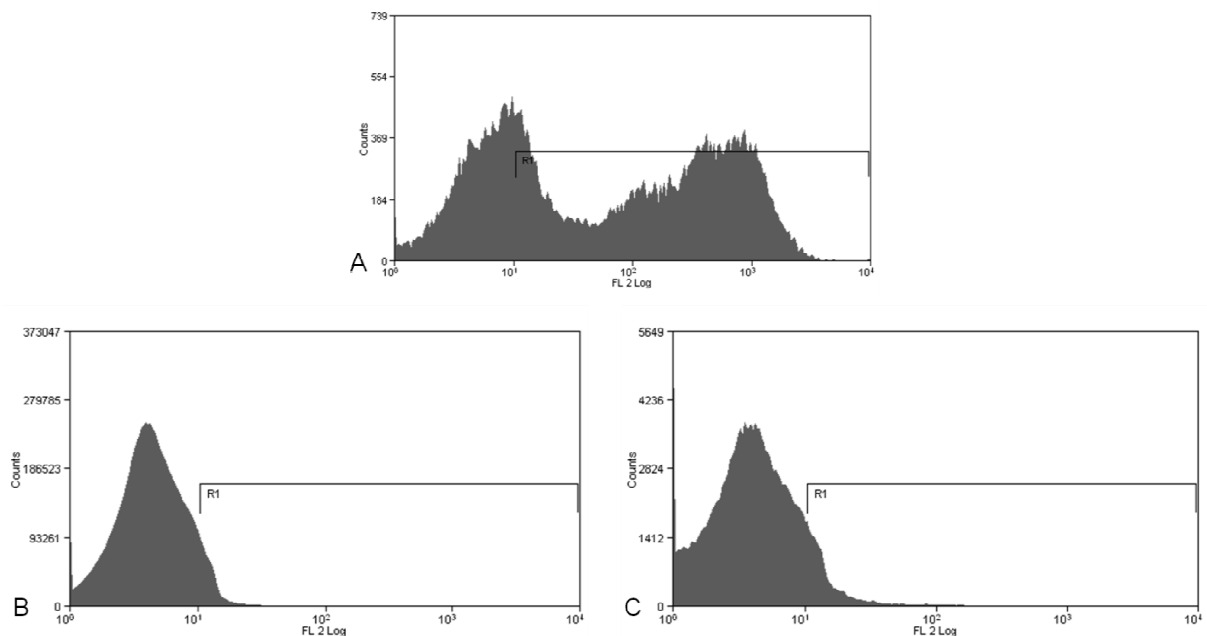


Abbildung 4.6.5.: Histogramm der Myc-Färbung (A) Sortierung (B) und Resortierung (C) der zweiten Screening-Runde der VHH-Bibliothek gegen das Suizidsubstrat. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz (FL2) gegen die Anzahl der Ereignisse (Counts).

Wie bei der ersten Sortierung wurde das Fenster so gelegt, dass Zellen mit einer relativen Fluoreszenz größer 10 aussortiert wurden. Insgesamt wurden $1,1 \times 10^7$ Zellen durchmustert. Von

den durchmusterten Zellen konnten $7,3 \times 10^4$ (1,1 %) Zellen aussortiert werden. Für eine Resortierung wurde das Sortierungs-Fenster wiederum etwas stringenter gewählt und von den $1,9 \times 10^5$ durchmusterten Zellen 6063 (3,75 %) aussortiert. Anhand der folgenden Verdünnungsplattierung konnte ermittelt werden, dass ca. 5500 potenzielle Alsolase-Antikörper isoliert werden konnten. Diese wurden wiederum nach Kultivierung in SD-Medium zentrifugiert und in *freezing-solution* bei -80°C gelagert.

4.6.2.1. IDENTIFIZIERUNG POTENZIELLER EINZELKLONE

Wie auch bei der SnoaL-Muteinbibliothek (4.5.3.1.) wurden 50 einzelne Hefekolonien aus der zweiten *Screening*-Runde gegen das Suizidsubstrat analysiert. Zunächst wurde mit Hilfe einer Kolonie-PCR das Vorhandensein des VHH-Gens überprüft. Dazu wurden die *Primer pCT seq up* und *pCT seq lo* verwendet. Anschließend wurden daraus 30 positiv getestete Klone in 5 ml SD-Medium in Kulturröhrchen kultiviert. Nach der Induktion in SG-PEG-Medium in kleinen Petrischalen (3.1.2.) wurden die einzelnen Kolonien über das cMyc-Epitop markiert und mit dem Suizidsubstrat gefärbt. Abbildung 4.6.6 zeigt exemplarisch an zwei Einzelklonen die Analyse der Fluoreszenzfärbungen am FACS.

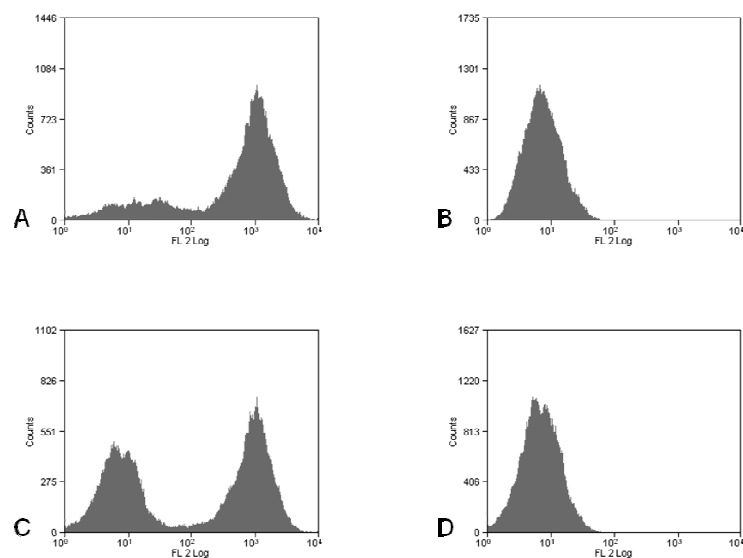


Abbildung 4.5.8.: Histogramme der FACS Messung der getesteten VHH Einzelklone aus der zweiten Sortierungsrunde. A: VHH Klon 1 Myc-Markierung; B: VHH Klon 1 mit Diketon markiert; C: VHH Klon 2 Myc-Markierung; D: VHH Klon 2 mit Diketon markiert. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz (FL2) gegen die Anzahl der Ereignisse (Counts).

Wie in Abbildung 4.6.6. zu erkennen ist, konnte anhand der positiven Myc-Färbung nachgewiesen werden, dass die analysierten VHH-Varianten auf der Oberfläche der Hefezellen präsentiert wurden. Jedoch konnte bei allen 30 Einzelklonen keine Bindung an das Suizidsubstrat festgestellt werden.

4.7. HERSTELLUNG EINES HAPTEN-KONJUGATS MIT DEM SUIZIDSUBSTRAT ZUR IMMUNISIERUNG EINES LAMAS

Eine weitere Möglichkeit für die Gewinnung katalytischer Antikörper ist die Immunisierung. Hierbei bildet der immunisierte Organismus mit Hilfe seines Immunsystems Antikörper gegen das gespritzte Immunogen (1.4.). Kleine Moleküle sind prinzipiell alleine nicht in der Lage eine Immunantwort hervorzurufen; deshalb koppelt man diese sogenannten Haptene an Trägerproteine (Hoffmann, 1998; List, 1998). Der Komplex aus Protein und gebundenem Hapten fungiert als vollwertiges Antigen (1.4.1.).

Für die Immunisierung eines Lamas wurde KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) als Hapten-Träger ausgewählt (1.4.1.). Der hochmolekulare Proteinkomplex der großen kalifornischen Schlüsselloch-Napfschnecke (*Megathura crenulata*) besitzt eine relative Molekülmasse von 8–32 Millionen (Hoffmann, 1998; List, 1998).

Die Herstellung des Hapten-Konjugats erfolgte ähnlich, wie bei der Biotinylierung des Suizidsubstrats über die freie Carboxylgruppe (4.4.2.). Die Kopplung wurde in MES-Puffer (pH 6,1) durchgeführt. Zur Aktivierung der Carboxyl-/Aminogruppe wurde NHS und EDC eingesetzt. Die Reaktion verlief, wie im Methodenteil unter 3.5.3. aufgeführt.

Anschließend wurde das Konjugat über eine PD10-Säule (Sephadex) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Dabei wurde zunächst der Durchfluss gesammelt und anschließend das Konjugat in zwei Fraktionen aufgenommen. Die Messung der Konzentration des gereinigten Konjugats erfolgte fotometrisch. Es wurde für eine Absorption von 1 bei 280 nm eine Konzentration von 1 mg/ml angenommen. Die errechnete Konzentration entsprach somit 1,5 mg/ml. Die Kontrolle der Kupplung erfolgte über einen ELISA. Dabei wurde die Bindung des gekuppelten Diketons an den Aldolase-Antikörper 38C2 überprüft. Zunächst wurden jeweils 10 µl des KHL-Konjugats in 90 µl PBS in Nunc Maxisorp-Platten gegeben. Als Negativ-Kontrolle diente hierbei 10 µl von der KLH-Stammlösung (10 mg/ml) in 90 µl PBS. Die Mikrotiter-Platte wurde über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Bevor am nächsten Tag die Zugabe des Aldolase-Antikörpers erfolgte wurden die einzelnen Vertiefungen der Platte mit PBS gewaschen und für zwei Stunden mit 3 % Milchpulver in PBS geblockt. Es wurden 10 µl einer 100 µg/ml Stammlösung des Antikörpers mit 90 µl PBS in die *wells* pipettiert und der Ansatz für eine Stunde bei RT schüttelnd inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe des anti-Maus Peroxidase Antikörpers (100 µl, 1:2000 in PBS) und eine weitere einstündige Inkubation bei RT. Das Pipettierschema ist in Tabelle 4.7.1. dargestellt.

Tabelle 4.7.1.: Pipettierschema der Kopplungs-Kontrolle von KLH und dem Suizidsubstrat.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| KLH + Dik Fraktion 1 (1:100) | KLH +Dik Fraktion 2 (1:100) | KLH – Dik (1:100) | 38C2 (1:500) | Durchfluss PD10 Säule | Diketon | PBS | - |
| Block | Block | Block | Block | Block | Block | Block | Block |
| 38C2 (1:1000) | 38C2 (1:1000) | 38C2 (1:1000) | - | 38C2 (1:1000) | 38C2 (1:1000) | 38C2 (1:1000) | - |
| anti Maus Peroxidase (1:2000) | anti Maus Peroxidase (1:2000) | anti Maus Peroxidase (1:2000) | anti Maus Peroxidase (1:2000) | anti Maus Peroxidase (1:2000) | anti Maus Peroxidase (1:2000) | anti Maus Peroxidase (1:2000) | |
| <i>TMB one</i> HCl | <i>TMB one</i> HCl | <i>TMB one</i> HCl | <i>TMB one</i> HCl | <i>TMB one</i> HCl | <i>TMB one</i> HCl | <i>TMB one</i> HCl | <i>TMB one</i> HCl |

Anschließend erfolgte die Entwicklung der Peroxidase-Reaktion mit *TMB-one solution*. Das Ergebnis der Gelbfärbung nach Zugabe von Salzsäure wurde im ELISA-Reader detektiert (Abbildung 4.7.1.).

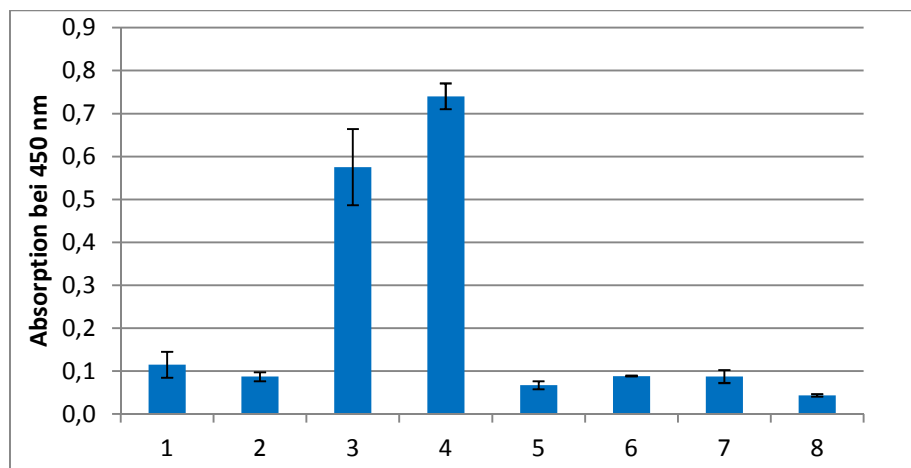


Abbildung 4.7.1. Dreifachbestimmung der ELISA-Reader Messung nach KLH-Bindung an den Aldolase-Antikörper 38C2

In Abbildung 4.7.1. Reihe 1 und 2 ist die Messung der Dreifachbestimmung der Bildung des KLH-Konjugats an den Aldolase-Antikörper 38C2 dargestellt. Die geringe Absorption kommt dadurch zustande, dass die eingesetzte Konzentration 10-fach geringer war, als die Konzentration des solitären KLH-Proteinkomplexes, da dieser als Negativ Kontrolle fungieren sollte. Wie man in Abbildung 4.7.1. Reihe 3 erkennen kann, bindet der Aldolase-Antikörper 38C2 aber auch an den solitären KLH-Proteinkomplex. Da somit die Bindung des Suizidsubstrats an das KLH nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine andere Möglichkeit gesucht den Erfolg der Konjugation zu überprüfen. Da eine normale Antikörperbindung über einen pH-shift gelöst werden kann, jedoch die kovalente Verknüpfung mit dem Suizidsubstrat bestehen bleibt, wurde ähnlich, wie bei der unspezifischen Phagen-Elution (4.5.2.), ein Elutionsschritt mit Glycin (pH 2,2) eingeführt. Das Schema der Bindungskontrolle ist in Tabelle 4.7.2. aufgezeigt.

Tabelle 4.7.2.: Pipettierschema der Kopplungs-Kontrolle von KLH und dem Suizidsubstrat.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| PBS | KLH (1:100) | KLH + Diketon Fraktion1 unverdünnt | KLH + Diketon Fraktion 2 unverdünnt | KLH (1:100) |
| Block | | | | |
| Waschen (10x) | | | | |
| 38C2 (1:1000) | 38C2 (1:1000) | 38C2 (1:1000) | 38C2 (1:1000) | 38C2 (1:1000) |
| Waschen (5x) | | | | |
| Glycin pH2,2 | Glycin pH2,2 | Glycin pH2,2 | Glycin pH2,2 | PBS |
| Waschen (5x) | | | | |
| Anti Maus Peroxidase (1:2000) | Anti Maus Peroxidase (1:2000) | Anti Maus Peroxidase (1:2000) | Anti Maus Peroxidase (1:2000) | Anti Maus Peroxidase (1:2000) |
| Waschen (10x) | | | | |
| TMB one / HCl | TMB one / HCl | TMB one / HCl | TMB one / HCl | TMB one / HCl |

Nach der Entwicklung der Peroxidase-Reaktion wurde die Absorption im *ELISA-Reader* vermessen (Abbildung 4.7.2.).

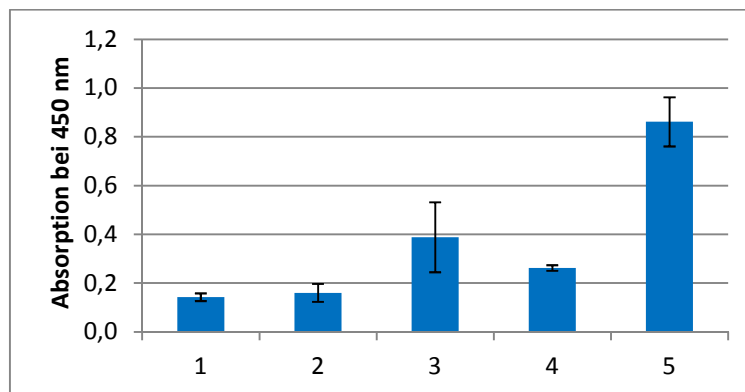


Abbildung 4.7.2.: Dreifachbestimmung der *ELISA-Reader* Messung der Kontrolle des KLH-Konjugats mit dem Aldolase-Antikörper 38C2.

Wie in Abbildung 4.7.2. zu erkennen ist, weisen die Vertiefungen der Maxisorp Platte mit dem Hapten-Konjugat (3 und 4) eine relative Absorption größer 0,2 auf. Wohingegen die relative Absorption in Vertiefung 2 unter 0,2 liegt. Dies bedeutet, dass nach dem *pH-shift*, der Aldolase-Antikörper vom KLH-Proteinkomplex gelöst wurde, was man auch im Vergleich zu Vertiefung 5 sieht, bei dem kein *pH-shift* stattgefunden hat. Da die Absorption in den *wells* mit dem Hapten-Konjugat im Vergleich zur Negativ-Kontrolle und dem solitären KLH erhöht ist, wurde daraus geschlossen, dass die Bindung des Suizidsubstrat an den Aldolase-Antikörper erfolgreich war und somit auch die Kopplung des Substrats an den KLH-Proteinkomplex. Von dem getesteten

KLH-Konjugat aus Fraktion 1 wurden anschließend 200 µl einer 1mg/ml konzentrierten Lösung für die dreimalige Immunisierung eines Lamas eingesetzt.

4.8. AUFBAU EINES FOTOMETRISCHEN ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG DER PRODUKTBILDUNG DER ALDOLASE-VARIANTEN

In diesem Abschnitt wird die Entwicklung eines fotometrischen Assays beschrieben, welches ermöglicht die Quantifizierung der Produktbildung der Aldolase-Varianten nachzuweisen. In diesem kontinuierlichen Assay wird ein Cofaktor-abhängiges an die Produktbildung gekoppeltes Signal detektiert. Eine NADPH-abhängige Baeyer-Villiger-Oxidation liefert hierbei die Primärprodukte der Aldol-Cyclisierung. Da die Cyclopentadecanone-Monooxygenase (CPDMO) aufgrund ihrer hohen Substratspezifität alle nötigen Anforderungen dafür besitzt (Iwaki, 2006), wurde ein synthetisches Gen, optimiert für die Expression in *E. coli*, bestellt.

4.8.1. KLONIERUNG UND EXPRESSION EINER CYCLOPENTADECANONE-MONOOXYGENASE (CPDMO)

Für die Klonierung der CPDMO wurden zunächst kompetente *E. coli* TOP10 Zellen mit dem gelieferten Plasmid transformiert und dieses vermehrt. Um den Einbau von Mutationen durch Amplifikation mittels PCR zu vermeiden, wurde das Gen der CPDMO nach erfolgreicher Plasmid-Präparation mit den Restriktions-Enzym *SfiI* aus dem Vektor gespalten. Es folgte eine Ligation mit dem ebenfalls *SfiI*-verdautem Plasmid pBAD. Dieses ermöglicht die Expression von Genen unter Kontrolle des Arabinose-Promoters. Anschließend wurden wiederum *E. coli*-Zellen des Stamms Top10 mit dem Ligationsansatz transformiert. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Testrestriktion mit *SfiI* überprüft und auf einem Agarosegel analysiert. Eine Sequenzierung des Gens wurde nicht unternommen, da nicht davon auszugehen war, dass Mutationen inseriert wurden. Die Expression und Reinigung der CPDMO erfolgte wie in Abschnitt 4.1.3 bei SnaoL und AknH beschrieben. Nach Dialyse der proteinreichen Fraktionen wurden diese auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 4.8.1.) und die Gesamtproteinausbeute fotometrisch bestimmt.

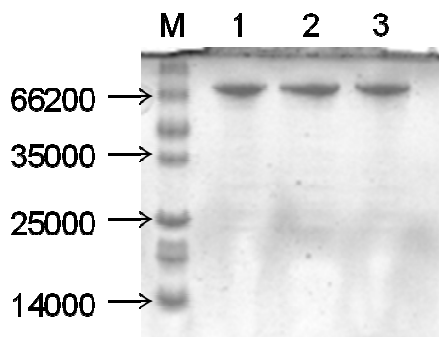


Abbildung 4.8.1.: SDS-Gel der proteinreichen Fraktionen der CPDMO nach Dialyse. M: *Fermentas*® *Molecular Weight Marker*. Spur 1: 60 mM Imidazol Fraktion nach Dialyse, Spur 2: 100 mM Imidazol Fraktion nach Dialyse, Spur 3: 200 mM Imidazol nach Dialyse.

Nach Vereinigung der einzelnen Fraktionen konnte eine Proteinmenge von 12,5 mg aus einem Liter Zellkultur gewonnen werden. Jedoch war diese Ausbeute bei erneuten Produktionen nicht mehr reproduzierbar. Da für einen kontinuierlichen Assay allerdings große Mengen an Enzym benötigt wurden, musste eine neue Expressionsmöglichkeit gefunden werden. Nach Iwaki *et al.* (2006) wurde das Plasmid pSD80 verwendet, um große Mengen an Enzym rekombinant zu generieren. Dieser Vektor besitzt einen *tac*-Promoter und eine Ampicilin-Resistenz. Für die Klonierung musste das Gen zunächst mit den Primern *CPDMO Hind up neu* und *CPDMO His Eco lo neu* amplifiziert werden. Dabei wurden die für die Klonierung nötigen Restriktions-Schnittstellen, sowie ein Penta-His-tag an das Gen angefügt. Nach Verdau des PCR-Produktes und des Expressions-Plasmids mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII*, erfolgte die Ligation der vorbereiteten Edukte. Zur Transformation wurden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen verwendet. Die Klonierung wurde abschließend anhand von Testrestriktionen und Sequenzierungen zweier Einzelklone überprüft. Die Expression wurde zunächst in 500 ml LB-Medium getestet. Dabei wurden die Zellen eines sequenzierten Einzelklons aus einer Übernachtskultur zunächst in 50 ml dYT-Medium überführt und bis zu einer leichten Trübung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellkultur komplett in die 500 ml LB-Medium überführt und weiter bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Es folgte die Induktion nach Zugabe von 500 µl 1 M IPTG, die Zellen wurden dabei über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Der Zellaufschluss und die Aufreinigung der Proteine erfolgte wie unter 3.3.1 und 3.3.2. beschrieben. In Abbildung 4.8.2. ist das SDS-Gel der einzelnen IMAC-Fractionen der Aufreinigung gezeigt.

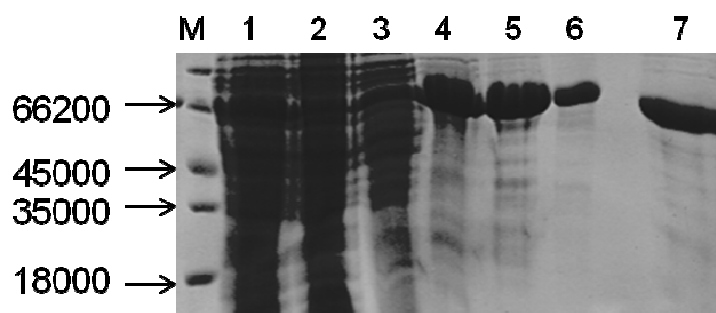


Abbildung 4.8.2.: SDS-Gel der einzelnen IMAC-Fractionen der Aufreinigung der CPDMO. M: *Fermentas® Molecular Weight Marker*. Spur 1: Zellaufschluss, Spur 2: Durchfluss, Spur 3: Waschschrift mit 40 mM Imidazol, Spur 4: 100 mM Imidazol in PBS, Spur 5: 200 mM Imidazol in PBS, Spur 6: 500 mM Imidazol in PBS, Spur 7: 100-500 mM Imidazol-Fractionen vereinigt nach Dialyse.

Die signifikanten Banden der Spuren 4-7 verlaufen jeweils in der erwarteten Größe der CPDMO (MW=68313). In Spur 7 sind die vereinigten Fraktionen von 100-500 mM Imidazol in PBS nach der Dialyse aufgetragen. Eine Konzentrationsbestimmung dieser Proteinlösung ergab eine Gesamtproteinausbeute von 26 mg aus 500 ml Zellkultur. Anhand der gelblichen Färbung der dialysierten Proteinlösung ließ sich vermuten, dass bereits FAD als Co-Faktor bei dem

gereinigten Enzym mit eingebaut wurde. Zur Überprüfung der Enzymaktivität, wurde die Probe an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fessner (TU-Darmstadt) weiter gegeben.

4.8.2. ETABLIERUNG EINES FOTOMETRISCHEN ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG DER PRODUKTBILDUNG DER ALDOLASE-VARIANTEN

Um in späteren Experimenten die Produktbildung möglicher Aldolase-Varianten zu quantifizieren, wurde nach Iwaki, *et al.* ein fotometrischer Assay etabliert. Die Menge des umgesetzten Substrats wird dabei indirekt über den Verbrauch des Co-Faktors NADPH der Baeyer-Villiger-Oxidase (CPDMO) ermittelt. Der NADPH-Umsatz wird dabei über die Änderung der Absorption bei 340 nm fotometrisch verfolgt. Als Substrat für positive Aldolase-Varianten wäre das 2,15-Hexadecadion einsetzbar, sofern dieses nicht auch von der CPDMO unter NADPH-Verbrauch umgesetzt wird. Die Arbeiten hierzu wurden von Dipl. Chem. Thomas Scheidt (AG Fessner, TU-Darmstadt) durchgeführt. In Abbildung 4.8.3. ist das gekoppelte Reaktionsschema der Produktbildung dargestellt.

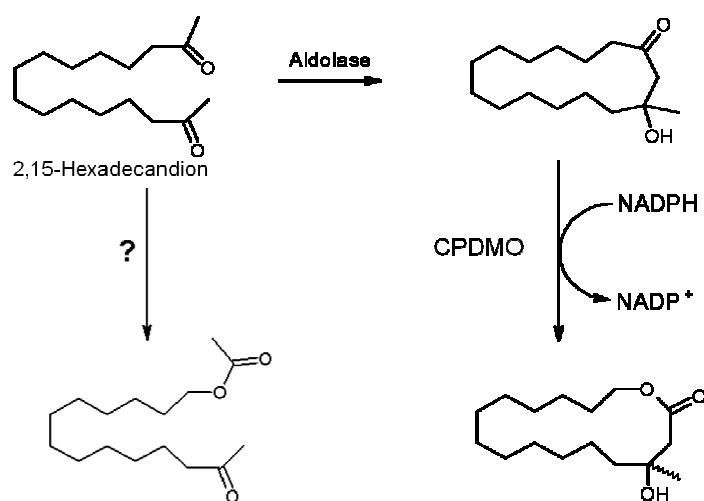
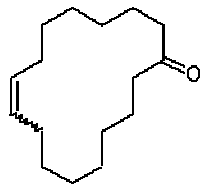
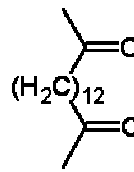


Abbildung 4.8.3.: Reaktionsschema der Quantifizierung der Produktbildung der Aldolase-Varianten über den NADPH-Verbrauch der Baeyer-Villiger-Oxidase Cyclopentadecanone-Monooxygenase (CPDMO) nach Iwaki, 2006.

In ersten Vorversuchen ohne den Einsatz einer Aldolase konnte gezeigt werden, dass die rekombinant produzierte Cyclopentadecanone-Monooxygenase in der Lage ist Cyclohexanon, *p*-Phenylcyclohexanon, Cyclopentadecanon, Cyclohexadecanon (Daten nicht gezeigt) und Globanon umzusetzen. Die Durchführung der Tests erfolgte nach Iwaki, *et al.* (2006). Im Folgenden sind die Ergebnisse der Messung von Globanon und dem offenkettigen 2,15-Hexadecadion vergleichend dargestellt. Abbildung 4.8.4. zeigt die Strukturformeln der beiden genannten Substrate.



Globanone



2,15-Hexadecandione

Abbildung 4.8.4.: Strukturformeln von Globanone und 2,15-Hexadecandione.

Für den Umsatz des ringförmigen Globanons der CPDMO konnte eine Abnahme des Co-Faktors NADPH über den Zeitraum von 10 min fotometrisch bei 340 nm detektiert werden (Abbildung 4.8.5.A). Dies war bei dem offenkettigen 2,15-Hexadecandione nicht der Fall (Abbildung 4.5.8.B).

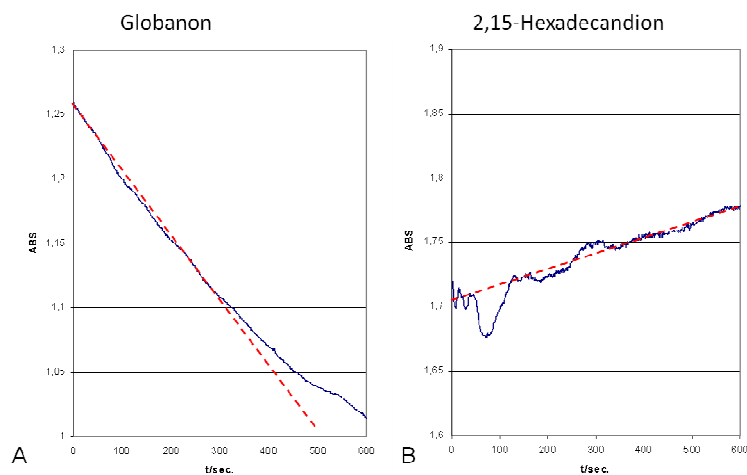


Abbildung 4.8.5.: Grafische Darstellung der fotometrischen Messung des NADPH-Verbrauchs der CPDMO. A: Globanone als Substrat zugegeben. B: 2,15-Hexadecandione als Substrat zugegeben. Es wurde die relative Absorption bei 340 nm in einem Zeitraum von 10 min detektiert.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es denkbar, 2,15-Hexadecandione als Substrat zur Quantifizierung der Aktivität vermeintlicher Aldolase-Varianten einzusetzen.

5. DISKUSSION UND AUSBLICK

5.1. DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines experimentellen Zugangs zur Zyklisierung eines linearen Diketons über einen Klasse I-Aldolase-Mechanismus. Dafür wurden zunächst Proteingerüste identifiziert, welche den Anforderungen einer solchen Reaktion entsprechen (5.1.1.). Durch ortsgerichtete Installation von Lysinresten im aktiven Zentrum der ausgewählten Proteingerüste sollte zunächst über eine Schiffbasen-Bildung der Klasse I-Aldolase Mechanismus nachgestellt werden (5.1.2.). Da die eingebauten Lysinreste von vornherein nicht in der Lage waren, eine Aldol-Reaktion zu katalysieren, wurden Aminosäure-Positionen in der näheren Umgebung der Lysinreste randomisiert, um so durch die Einflüsse der benachbarten Reste einen eingebauten Lysinrest zu aktivieren (5.1.3.). Zur Identifikation dieser aktivierten Lysinreste wurden die Muteinbibliotheken auf verschiedene Weisen durchmustert (5.1.5.). Für die Durchmusterung im Hochdurchsatz-Verfahren wurden Suizidsubstrate hergestellt, welche mit dem funktionellen Lysinrest eine kovalente Bindung eingehen und somit als Marker für eine Aldolreaktion fungieren können (5.1.4.).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Verfahren zur Suche nach cameliden Antikörpern, welche ebenfalls in der Lage sein sollten eine Aldolreaktion zu katalysieren. Dazu wurden VHH-Bibliotheken mittels *Phage*- und *Yeast-Display* auf die Bindung des Suizidsubstrats hin durchmustert (5.1.6.). Eine weitere Möglichkeit, katalytische Antikörper zu gewinnen, ist die Immunisierung. Da nach Schwere-Ketten-Antikörpern gesucht wurde, erfolgte die Immunisierung eines Lamas mit dem Suizidsubstrat als Hapten-Konjugat (5.1.7.).

Zusätzlich wurde für die spätere Quantifizierung der Produktbildung der Aldolase-Varianten ein kontinuierlicher *Assay* etabliert, bei dem ein Cofaktor-abhängiges, an die Produktbildung gekoppeltes Signal detektiert wird (5.1.8.).

5.1.1. SUCHE NACH GEEIGNETEN PROTEIN-*SCAFFOLDS* FÜR DIE ZYKLISIERUNG EINES LINEAREN DIKETONS

Auf der Suche nach einem neuen Zugang zu einer biotechnischen Produktion von makrozyklischen Moschusriechstoffen sollten Proteingerüste gefunden werden, welche in der Lage sind die, Zyklisierung eines langkettigen linearen Diketons über eine Aldoladdition zu katalysieren.

Die Anforderungen, die zunächst an ein Proteingerüst gestellt wurden, waren eine ausreichende Größe der Substrattasche für eine C16-Kette, eine existierende Kristallstruktur und ein Modell für die Zyklisierung. Die Selektion der *Scaffolds* fiel nach Durchmusterung der

Proteinstrukturdatenbanken auf die Polyketid Cyclasen SnoaL und AknH und die Terpen-Synthasen Pentalenene- und Aristolochene-Synthase (1.3.). Diese verfügen bereits über ein weitgehend hydrophobes aktives Zentrum der benötigten Dimension, um ein lineares Kohlenstoffgerüst der Länge von C16 als Substrat zu akzeptieren (Rabenhorst, 2007).

In Abschnitt 4.1. wurde zunächst die Exprimierbarkeit der verschiedenen Proteingerüste in *E. coli* getestet und eine stabile reproduzierbare Methode der Proteinproduktion gefunden. Da die Polyketid-Cyclasen SnoaL und AknH bereits in einem Expressions-Plasmid von Prof. Dr. G. Schneider (Karolinska-Institut, Schweden) zur Verfügung gestellt wurden, war es naheliegend, die Proteine auch in diesem zu produzieren. Die Durchführung der Produktion erfolgte daher auch wie in Azmiri *et. al.* (2004) beschrieben. Erfreulicherweise konnten die Proteine der Polyketid-Cyclasen AknH und SnoaL ohne Probleme mit einer Ausbeute von 8,8 mg und 10,7 mg aus einem Liter Bakterienkultur rekombinant synthetisiert und aufgereinigt werden (4.1.3.).

Bei den Sesquiterpen-Synthasen wurde vorerst versucht laut Cane und Kang (2000) eine Expression mit Hilfe des pET11a Vektors zu etablieren. Jedoch stellte sich nach wiederholten Produktionsversuchen heraus, dass eine Überexpression der löslichen Proteine in diesem Vektor nicht erfolgreich war.

Es ist möglich, dass es aufgrund der hohen Transkriptionsrate von dem T7-Promoter und dem starken Translationssignal des pET-Vektors während der Expression zur Bildung von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) kommt (Villaverde und Carrio, 2003; *pET System Manual*, Novagen). Isoliert man die homogenen Einschlusskörper, kann das exprimierte Protein schon in einer Reinheit von 90 % vorliegen (Langley, 1987). Dies ist aber nur ein Vorteil, wenn es eine effiziente Methode gibt, das isolierte Protein anschließend zu renaturieren. Da von Sesquiterpen-Synthasen in der weiteren Aufgabenstellung jedoch mehrere Varianten produziert und durchmustert werden sollten, war die Aufreinigung und Renaturierung von Einschlusskörpern keine Option. Daher wurde nicht weiter überprüft, ob die exprimierten Proteine tatsächlich als Einschlusskörper vorlagen.

Da die Expression der Polyketid-Cyclasen in dem Expressions-Plasmid pBAD stabil war, wurden die synthetisch generierten Gene der Sesquiterpen-Synthasen ebenfalls in den pBAD-Vektor kloniert. Die Basalexpression der pBAD-Vektoren ist sehr gering und die Expressionsrate kann genau durch die Induktorkonzentration (L-Arabinose) reguliert werden (Guzman, 1995). Die Expression der Sesquiterpen-Cyclasen erfolgte daher zunächst analog zu den Polyketid-Cyclasen. Hierbei konnte erstaunlicherweise die Pentalenene-Synthase mit einer Ausbeute von 10,4 mg aus einem Liter Zellkultur produziert werden. Die Expression der Aristolochene-

Synthase war jedoch auch nach wiederholten Versuchsansätzen im pBAD-Vektor nicht erfolgreich. Da die anderen Protein-*Scaffolds* in dem *E. coli*-Stamm TOP10 ohne weitere Probleme produziert werden konnten, wurde kein anderer Expressionsstamm getestet und dieser als Fehlerquelle ausgeschlossen. Um die Expressionsbedingungen anzupassen, wurden neben der Induktorkonzentration verschiedene Temperaturen und Zeiten für die Induktion getestet. Aber auch bei Temperaturen zwischen 25 und 28 °C oder auch 37 °C konnte keine stabile Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Weitere Studien zur Dauer der Induktion von 3-9 Stunden bis hin zur Über-Nacht-Expression blieben ebenfalls erfolglos. Es wurde auch nicht versäumt, das Zellysate auf eventuelle Bildung von *inclusion bodies* zu überprüfen. Da nicht ermittelt werden konnte, aus welchen Gründen die Aristolochene-Synthase nicht produziert werden konnte, wurde sie als ein weiteres Protein-*Scaffold* zur Zyklisierung eines linearen Diketons ausgeschlossen.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine stabile Expression der Proteingerüste SnoaL, AknH und der Pentalenene-Synthase in dem Vektorsystem pBAD möglich ist. Daher wurden die genannten Enzyme zur Konstruktion potenzieller Klasse I-Aldolase-*Scaffolds* eingesetzt.

5.1.2. KONSTRUKTION POTENZIELLER KLASSE I ALDOLASE-*SCAFFOLDS* DURCH ORTSGERICHTETE INSTALLATION VON LYSINRESTEN

Die Konstruktion potenzieller Klasse I Aldolase-*Scaffolds* durch ortsgerichtete Installation von Lysinresten ist in Abschnitt 4.2.1 beschrieben. Dabei wurden mit Hilfe des PyMOL-Programms Aminosäurereste im aktiven Zentrum der ausgewählten Proteingerüste in einem Radius von 9 Å lokalisiert und geeignete Mutationsstellen ausgemacht. Die Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren erfolgte allein nach der Ausrichtung der Reste in das Innere der Substrattasche. Dabei blieb der ursprüngliche Reaktionsmechanismus der Enzyme unberücksichtigt. So erfolgte beispielsweise bei der Polyketid-Cyclase SnoaL der Einbau eines Lysinrestes an der Position H107. Das dort ansässige Histidin ist zusammen mit dem Aspartat 121 und dem Histidin 119 für die Stabilisierung des Enolat-Intermediats zuständig (Azmiri, 2004).

Bei der Produktion der einzelnen SnoaL-Lysinvarianten wurde festgestellt, dass die Proteinausbeuten im Vergleich zum SnoaL-Wildtyp merklich geringer ausfielen. Grund hierfür könnten unter anderen sterische Hinderungen sein, wodurch die Proteine nicht mehr richtig gefaltet werden und es somit zu Einbußen in der Ausbeute kommt. Bei cytosolischer Expression sind Proteine, Nukleinsäuren und Ribosomen dicht gedrängt (*molecular crowding*), was beim Exponieren elongierender Polypeptidketten und Faltungsintermediate hydrophober Aminosäuren zur Aggregation der Proteinketten führen kann (Mogk, 1999). Diese

Aggregationen verhindern die weitere Proteinsynthese und werden oftmals proteolytisch abgebaut (Bukau, 2000). Die SnoaL-Lysinvariante V55K konnte mit einer Proteinausbeute von 7,6 mg aus einem Liter Zellkultur im größten Mengenverhältnis produziert werden und lag dabei auf einem ähnlichen Niveau wie die Expression des Wildtyps. Die Proteinausbeuten der anderen SnoaL-Lysinvarianten sind in Tabelle 5.1.1. zusammengefasst.

Tabelle 5.1.1.: Zusammenfassung der produzierten SnoaL-Varianten mit den jeweiligen Ausbeuten aus 1 l Zellkultur.

| Protein | Ausbeute aus 1 l Zellkultur |
|--------------------|-----------------------------|
| SnoaL wt | 10,7 mg |
| SnoaL H107K | 1,2 mg |
| SnoaL V55K | 7,6 mg |
| SnoaL N33K | 3,4 mg |

Ein weiteres Kriterium für die Auswahl eines geeigneten Aldolase-*Scaffolds* war die Präsentierbarkeit der Lysinvarianten auf der Oberfläche von Bakteriophagen und Hefezellen für ein Hochdurchsatz-*Screening*. Da alle ausgewählten Proteingerüste cytoplasmatische Enzyme sind, war es nicht selbstverständlich, dass diese auch exponierbar sind (Middleton, 1997). Obwohl schon gezeigt werden konnte, dass viele intra- oder extrazelluläre Proteine mit verschiedenen Größen und Strukturen funktionell auf der Oberfläche von filamentösen Phagen präsentiert werden (Russel, 2004), gibt es auch zahlreiche Proteine, die nur sehr schlecht oder gar nicht auf der Phagenoberfläche exponiert werden (Wilson und Finlay, 1998). Es gibt mehrere Gründe, weshalb die gewünschten Proteine nicht präsentierbar sein können. Die häufigste Ursache ist die Aggregation von Proteinen. Die Proteine können zum Beispiel im Periplasma aggregieren (Deng, 1994; Jung und Plückthun, 1997) oder auch im Cytoplasma, was oftmals zur Lyse der *E. coli* Zellen führt (Krebber, 1996). Jedoch konnte die Phagenproduktion der SnoaL-Lysinvarianten erfreulicherweise anhand von Western-*blot*-Analysen bestätigt werden (Abbildung 4.2.3.).

Die Lysinvarianten der Polyketid-Cyclase AknH wurden nach denselben Kriterien, wie den der SnoaL-Varianten geplant und konstruiert. Die AknH-Lysinvarianten wurden zur Aktivitätskontrolle in *deep-well* Platten produziert und aufgereinigt (4.2.2.). Aufgrund der sehr hohen Sequenzhomologie der beiden Polyketid-Cyclasen wurde jedoch nur eine als Proteingerüst ausgewählt. Dabei fiel die Wahl auf SnoaL, da diese Cyclase in den zuvor durchgeführten Expressionstest in einer größeren Ausbeute produziert werden konnte (4.1.2.).

Bei der Planung der Lysinvarianten der Pentalenene-Synthase wurden ebenfalls Aminosäurereste ausgetauscht, welche in einem Radius von 9 Å zum Inneren der Enzymtasche zeigen. Da die Kristallstruktur der Pentalenene-Synthase ohne Substrat vorlag (Lesburg, 1997)

konnte nur anhand des beschriebenen Reaktionsmechanismus ausgemacht werden, welche Aminosäurereste in die Substrattasche hineinragen (Seemann, 2004). Die ausgewählten Aminosäure-Reste I177, N219 und V301 zeigen alle in die Mitte einer 20 Å großen Spalte, welche, aufgrund des postulierten Reaktionsmechanismus, als aktives Zentrum definiert werden konnte (Lesburg, 1997).

Bei der Produktion der einzelnen Pentalenene-Synthase-Varianten musste festgestellt werden, dass die Lysinvarianten I177K und V301K im *E. coli* Stamm TOP10 nicht produziert wurden. Es ist zu vermuten, dass der Austausch der hydrophoben Aminosäuren Isoleucin und Valin in ein basisches Lysin zu Strukturveränderungen in der Pentalenene-Synthase führt und dass dadurch eine lösliche Expression der Proteine erschwert wurde. Der Austausch von Asparagin, einer polaren Aminosäure, zu Lysin der Pentalenene-Variante N219K hat zu keiner verminderten Proteinausbeute geführt, wie man auf dem SDS-Gel in Abbildung 4.2.6. Spur 4-6 erkennen kann. Diese Lysinvariante konnte im selben Mengenverhältnis wie der Wildtyp (10,4 mg aus 1 l Zellkultur) produziert werden.

Bei der anschließenden Analyse der Aldolase-Aktivität der jeweiligen Lysinvarianten wurde festgestellt, dass keiner der eingebauten Lysinreste positiv mit dem Aldol-Marker Methodol getestet werden konnte (4.2.2.). Dies kann zum einen daran liegen, dass das Substrat aufgrund von sterischen oder ladungsbedingten Hinderungen nicht in die Enzymtasche zum eingebauten Lysinrest vordringen konnte, oder dass die eingebauten Lysinreste aufgrund ihrer benachbarten Aminosäurereste inaktiv und protoniert vorliegen. Dass jedoch der Austausch einer einzigen Aminosäure ausreicht, um die Substratspezifität einer Aldolase zu ändern, konnten Baker und Seah mit einer Klasse II Pyruvat-Aldolase zeigen (Baker und Seah, 2012). Bei der Pyruvat-Aldolase BphI führte der Austausch des Leucins an der Position 87 zu einem polaren Asparagin, oder einem Tryptophan zu einem Verlust der Aktivität des Enzyms. Die Doppelmутanten dagegen (L87N; Y290F und L87W; Y290F) konnten das Sterioisomer des natürlichen Substrats des Enzyms umsetzen (Baker und Seah, 2012). Ein weiteres Beispiel für das rationale *Design* einer Aldolase beschrieben Müller und Kollegen 2009. Sie zeigten, dass ein einfaches β -Peptid (14-Helices) mit eingebauten Lysinresten als funktionelle Seitengruppen als Klasse I Aldolase agieren kann (Müller, 2009).

Bei der Konstruktion potenzieller Klasse I Aldolase-*Scaffolds* durch ortsgerichtete Installation von Lysinresten konnte gezeigt werden, dass es große Differenzen in den Proteinausbeuten bei den Produktionen der einzelnen Varianten gab. Erfreulicherweise waren die Proteinmengen der SnoaL Lysinvariante V55K und der Pentalenene-Synthase Lysinvariante N219K vergleichbar mit den Proteinmengen der jeweiligen Wildtypen. Zudem konnten erfolgreich das cytoplasmatische

Enzym SnoaL und dessen Lysinvarianten auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert werden. Jedoch zeigten die eingebauten Lysinreste der SnoaL-Varianten, sowie die der AknH- und Pentalenene-Synthase-Varianten keinen Umsatz des *Retro*-Aldol-Substrats Methodol. Um die Lysinreste der Proteingerüste einer anderen chemischen Umgebung auszusetzen, in der sie in der aktiven Form vorliegen können, wurde zunächst, basierend auf der SnoaL-Lysinvariante V55K eine Muteinbibliothek erstellt.

5.1.3. ERZEUGUNG VON MUTEINBIBLIOTHEKEN DURCH RANDOMISIERTE MUTAGENESE

Da die in Abschnitt 4.2. generierten Lysinvarianten allesamt nicht in der Lage waren, eine *Retro*-Aldolreaktion über eine Schiffbase zu katalysieren, wurden Muteinbibliotheken mit Hilfe randomisierter Mutagenese erstellt. Die so zufällig eingebauten benachbarten Aminosäuren sollten in der Lage sein, die eingebauten Lysinreste als Schiff-Base reagieren zu lassen. Da eine, für die *Retro*-Aldolreaktion notwendige, Imin-Bildung nur in wässriger Umgebung stattfinden kann (Johnsson, 1993), ist die große Herausforderung bei dem *Design* von *Retro*-Aldol-Katalysatoren ein nucleophiles Amin unter physiologischen Bedingungen zu bilden. Studien von Enzymen, welche eine Imin-, oder Enamin-Anordnung nutzen, zeigten, dass die Nucleophilie desamins durch die Coulomb-Interaktionen benachbarter Kationen signifikant gesteigert wird (Westheimer, 1995). Diese Strategie wurde auch schon erfolgreich bei dem *Design* von helicalen α -Peptiden mit *Retro*-Aldol-Mechanismus angewandt (Johnsson, 1993; Weston, 2004).

Als Startgerüst für die gelenkte Evolution wurde zunächst die SnoaL-Lysinvariante V55K ausgewählt. Diese zeigte in den vorangegangenen Expressionstests die größte Ausbeute (4.2.1.) und ließ sich auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentieren (4.2.1.).

Der Einbau von insgesamt vier Punktmutationen in das Gen der SnoaL-Lysinvariante V55K erfolgte mit Hilfe von SOE-PCRs und ist in Abschnitt 4.3.1. beschrieben. Die so erzeugte CAST-Bibliothek (*Combinatorial Active-Site Saturation Test*) (Reetz, 2004) wurde löslich produziert (4.3.1.) und auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert (4.3.2.). Dieses semi-rationale *Design* der Bibliotheken wurde gewählt, um die ursprüngliche Struktur der Proteingerüste zu erhalten. Es wäre ansonsten auch denkbar gewesen, ein evolutives Protein-*Design* mittels *error prone* PCR (Pritchard, 2005) oder DNA *shuffling* (Stemmer, 1994) einzusetzen. Ein Vorteil der CAST-Bibliotheken ist jedoch, dass deutlich kleinere Mutanten-Bibliotheken als beim evolutiven Protein-*Design* erforderlich sind (Reetz, 2005). Dies erleichtert erheblich den *Screening*-Aufwand. So können nach der ersten erfolgreichen „CASTing“-Runde weitere „CASTings“ (sog. „Re-CASTings“) durchgeführt werden (Reetz, 2005), was zu einer Steigerung der Aktivität oder Enantioselektivität der einzelnen Mutanten führen kann.

Für die Durchmusterung einzelner SnoaL-Varianten am FACS wurde eine weitere SnoaL-Muteinbibliothek erstellt (SnoaL-Muteinbibliothek II). Die Varianten wurden hierfür auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* präsentiert (4.3.3.). Um eine größere Vielfalt an Muteinen zu erzeugen, wurde diese Bibliothek aus drei Unterbibliotheken aufgebaut. Die randomisierten Positionen wurden anhand von Strukturanalysen mit Hilfe des *PyMol*-Programms ausgewählt. Für die Durchmusterung der erstellten Muteinbibliotheken wurden sogenannte Suizidsubstrate synthetisiert. Diese sollen den aktiven Lysinrest im Inneren des Enzyms via Schiffbase kovalent binden.

5.1.4. SYNTHESE UND BIOTINYLIERUNG VON *SCREENING*-SUBSTRATEN

Nach Erhalt der einzelnen Suizidsubstrate wurden diese zunächst in der HPLC und mittels Massenspektrum analysiert (Abbildung 4.4.2.A und Abbildung 4.4.5.A). Dabei wurde festgestellt, dass die Proben mehrere Verunreinigungen aufwiesen. Nach wiederholten, vergeblichen Versuchen die gewünschten Produkte mittels HPLC von den Edukten und Nebenprodukten zu trennen, wurden diese Versuche eingestellt und für die Biotinylierung die unaufgereinigten Substrate eingesetzt. Bei den Versuchen, das biotinylierte Substrat aufzureinigen ergaben sich jedoch die gleichen Probleme, wie bei den vorigen Reinigungs-Versuchen. Die Reinigung der Substrate ging außerdem einher mit einem großen Verlust der Ausbeute und somit wurde entschieden, das unaufgereinigte Substrat für die *Screening*-Versuche einzusetzen. Ein weiteres Problem der Suizidsubstrate war deren Instabilität. Das Amin-Derivat des Diketons oxidierte beispielsweise schon nach wenigen Stunden und musste deshalb direkt für die Biotinylierungs-Reaktion eingesetzt werden. Aber auch nach Biotinylierung und Lagerung des Substrats bei -20 °C wurde ein Zerfall des Produktes nach einem Monat in der LC-MS beobachtet (Abbildung 4.4.3.B). Das Diketon-Derivat mit der freien Carboxyl-Gruppe erwies sich aufgrund der Säuregruppe als etwas stabiler und konnte mit Biotin-Amin umgesetzt werden. Jedoch ergaben sich auch hier Probleme bei der Trennung des Produktes von den eingesetzten Edukten. Einzig das freie Biotin konnte in der HPLC von den anderen Produkten getrennt werden. Hinzu kamen noch Probleme bei der Löslichkeit der Suizidsubstrate. Diese fielen in wässrigen Lösungen aus und konnten nur mit 10 % DMF oder DMSO in Lösung gebracht werden. Die Funktionalität des 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dions konnte jedoch mit Hilfe des Aldolase-Antikörpers 38C2 nachgewiesen werden (4.4.3.).

Alternativ zu einem Biotin-gekuppelten Suizidsubstrat wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fessner (TU-Darmstadt) versucht, ein Fluoreszenz-basiertes Substrat nach Tanaka, *et al.* (2005) zu synthetisieren. Jedoch konnte dieses Substrat nicht rechtzeitig für die *Screening*-Versuche fertig gestellt werden. Die Syntheseroute ist in Abbildung 5.1.1. dargestellt.

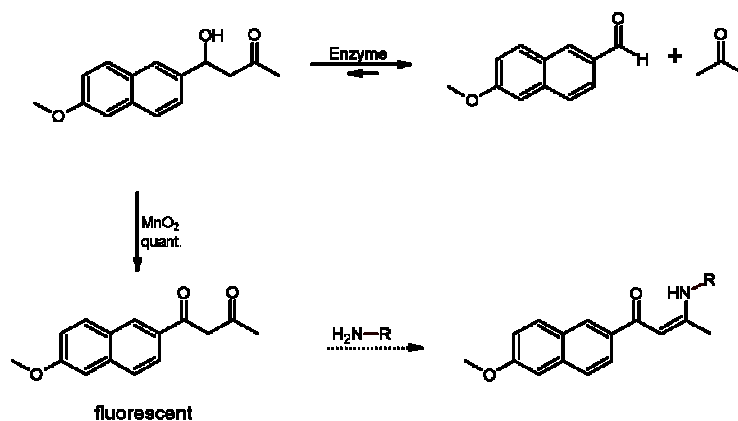


Abbildung 5.1.1.: Syntheseroute eines fluoreszierenden Suizidsubstrats. R = über Schiffbase gebundenes Protein.

Das fluoreszierende Suizidsubstrat verliert seine fluorogenen Eigenschaften, sobald das Enzym über ein Lysin via Schiffbase bindet. Die so gequenchte Fluoreszenz könnte dann im ELISA-Reader detektiert werden.

Es konnte mittels LC-MS bestätigt werden, dass die Biotinylierung der Suizidsubstrate erfolgreich war. Jedoch war die Reinigung der Substrate trotz mehrerer Optimierungs-Versuche nicht zufriedenstellend. Trotzdem konnte mit Hilfe des Aldolase-Antikörpers 38C2 gezeigt werden, dass das 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dions funktionsfähig ist und somit für die Durchmusterung der Mutein-Bibliotheken eingesetzt werden kann.

5.1.5. DURCHMUSTERUNG DER SNOAL-MUTEINBIBLIOTHEKEN

Die Durchmusterung der SnaoL-Muteinbibliotheken auf der Phagen- und Hefe-Oberfläche erfolgte durch Zugabe der biotinylierten Suizidsubstrate (4.5.2. und 4.5.3.). Für das *Screening* der löslichen Proteinbibliothek wurde ein fluoreszenzbasierender Assay mit dem Aldolase-Marker Methodol (List, 1998) eingesetzt (4.5.1.).

Vor der Durchführung des fluoreszenzbasierten Assays musste zunächst sichergestellt werden, dass die Expressions-Methode im 96-well Format in einem Volumen von 1,5 ml stabil ist und reproduzierbar gelingt. Auch die Aufreinigung der produzierten Varianten in einem Volumen von nur 200 µl musste vorher etabliert werden. Wie sich anhand der Abbildung 4.3.4. erkennen lässt, konnten die verschiedenen Lysin SnaoL-Varianten erfolgreich in diesem Format produziert und aufgereinigt werden. Dieses *Screening*-Verfahren erwies sich jedoch als sehr aufwendig und kostspielig, da zunächst jeder der zu testenden Einzelklone in *deep-well*-Platten angezogen, einzeln induziert und anschließend die Proteine mittels Magnet-beads gereinigt werden mussten (4.2.1.). Der Vorteil bei diesem *Screening*-Verfahren liegt jedoch darin, dass davon auszugehen ist, dass die gereinigten Proteine in einer korrekt gefalteten Form vorliegen, da die Produktion nach Azmiri *et. al.*, 2004, nur in einem kleineren Maßstab durchgeführt

wurde. Dennoch wurde dieses *Screening*-System nach ersten Versuchen aufgrund zu hoher Kosten eingestellt und auf die Hochdurchsatz-Durchmusterung mittels *Phage*- und *Yeast-Display* umgestellt.

Zunächst wurden die Phagen der SnoaL-Muteinbibliothek wie in Abschnitt 4.5.2. beschrieben produziert und für die Durchmusterung mit dem biotinylierten Suizidsubstrat bereitgestellt. Die ersten vier *Screening*-Runden erfolgten, indem die Phagen mittels TEV-Protease-Spaltung von dem biotinylierten Substrat auf der Oberfläche der immobilisierten Magnetkügelchen eluiert wurden (Abbildung 4.5.2.). Da aber keine Anreicherung in den ermittelten Phagentitern der einzelnen Runden festgestellt werden konnte, wurde zunächst davon ausgegangen, dass die Restriktion der Protease nicht erfolgreich gewesen war. Die Aktivität der TEV-Protease wurde daraufhin mit den Phagen der ersten beiden *Screening*-Runden gegen das Suizidsubstrat getestet und mittels *Western-blots* detektiert (Abbildung 4.5.3.). Die Untersuchungen ergaben, dass die eingesetzte Protease aktiv war.

Zusätzlich wurde eine weitere Methode zur Elution der Phagen etabliert. Bei dieser Elutions-Methode sollten durch einen zusätzlich eingeführten pH-*shift* zunächst unspezifisch gebundene Phagen von den Magnet-*beads* eluiert werden. Die aktiven Lysinreste der gesuchten SnoaL-Varianten sollten über die kovalente Schiffbasen-Bindung des biotinylierten Suizidsubstrats an den Streptavidin-beschichteten Magnetkügelchen gebunden bleiben und so gebunden in der Lage sein, über das Phagenprotein pIII die eingesetzten *E. coli* Zellen des Stamms ER2738 zu infizieren. Mit dieser Elutions-Methode wurden dreimal vier *Screening*-Runden gegen das HPLC-gereinigte biotinylierte NH₂-Derivat des Suizidsubstrats durchgeführt. Wie man jedoch in Tabelle 4.5.1. erkennt, konnten auch bei diesen *Screenings* keine Anreicherung festgestellt werden, die sich in einem erhöhten Phagentiter dargestellt hätte. Dies lässt zunächst die Vermutung aufkommen, dass keine aktivierten Lysinreste unter den durchmusterten SnoaL-Varianten vorhanden sind, da ansonsten eine Anreicherung vermeintlich positiver Varianten hätte stattfinden müssen. Um zu überprüfen, ob das Plasmid der SnoaL-Phagenbibliothek bei der Amplifikation der einzelnen Phagenrunden intakt geblieben war, wurde eine Kolonie-PCR einzelner Klone aus der dritten *Screening*-Runde durchgeführt. Bei der Auswertung des Agarose-Gels wurde festgestellt, dass die amplifizierten Gene nicht der erwarteten Größe von 976 bp entsprachen (siehe Abbildung 4.5.4.). Die eingesetzten *Primer M13 rev up* und *pIII-Clal lo* binden komplementär auf dem pAKds-MT Vektor vor und nach den inserierten SnoaL-Varianten und müssen bei Vorhandensein des Plasmids auf jeden Fall ein PCR-Produkt liefern. Da jedoch das amplifizierte Vektorfragment nicht der Größe des als Positiv-Kontrolle eingesetzten pAKds-MT-SnoaLwt Vektor entsprach, ist davon auszugehen, dass bei der Amplifikation der Phagenrunden ein Teil des Fusionsgens der SnoaL-Varianten und dem pIII-Gen verloren gegangen ist. Eine

mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass keine positiven Lysinvarianten in der Bibliothek vorhanden waren und sich unspezifische Binder von Runde zu Runde angereichert haben. Es ist ein weit verbreitetes Problem des *Phage-Displays*, dass das pIII-Fusionsprotein weniger effizient in die Phagenhülle integriert wird, als das native pIII-Protein aus dem Genom des Helfer-Phagen (Kramer, 2003). Daraus resultiert, dass die große Mehrheit der Phagen kein Fusionsprotein auf der Oberfläche trägt. Hinzu kommt, dass *Phagemid*-Bibliotheken oftmals viele Klone enthalten, die von vornherein schon keine Fusionsgene, aufgrund von *stop codons* oder *frame shifts*, enthalten. Werden solche Phagen während der Amplifikationsrunden angereichert, vergrößert sich die Anzahl der Zellen, die kein Fusionsprotein exprimieren (Azzazy, 2002). Kramer und Kollegen entwickelten daraufhin einen VCSM13-abgeleiteten Helfer-Phagen (CT Helfer-Phage), welcher verspricht die beschriebenen Probleme zu umgehen. Diesem CT Helfer-Phage fehlt das Genom der infektiösen N1 und N2 Domänen des pIII-Proteins. Dadurch können nur Phagen amplifiziert werden, die ein vollständiges pIII-Fusionsprotein präsentieren (Kramer, 2003). Kramer und Kollegen konnten zeigen, dass der Einsatz des neu entwickelten Helfer-Phagen die Anreicherung unspezifischer Phagen reduziert und eine höhere Selektionseffizienz erreicht wird. Ein solcher Helferphage stand für diese Experimente leider nicht zur Verfügung.

Um zu überprüfen, ob vielleicht auch verkürzte Varianten in der Lage sind eine Schiffbasen-Binding einzugehen, wurden trotz Verlust von Teilen des SnaL-pIII-Fusionsproteins mehrere Einzelklone aus der dritten und vierten *Screening*-Runde gegen das Diketon an Hand des *Retro*-Aldoltests analysiert (4.5.2.1.). Da keine positiven SnaL-Varianten gefunden werden konnten, wurde außerdem versucht mit Hilfe von Streptavidin-beschichteten ELISA-Platten (3.1.7.1.) und Nunc *Maxi-sorp*-Platten (3.1.7.2.) vermeintlich positive Suizidsubstrat-Binder zu detektieren. Aber auch bei diesen Verfahren konnten keine positiven Klone identifiziert werden. Somit wurde das *Screening* via *Phage-Display* eingestellt und zum Hefe-*Display* gewechselt (4.5.3.). Die Vorteile des Hefe-*Displays* sind zum Einen das Ausbleiben der wiederholten Amplifikationen der einzelnen *Screening*-Runden und zum Anderen die Durchmusterung der Varianten am FACS.

Vor der Durchführung des Hefe-*Screenings* wurde das gereinigte biotinylierte NH₂-Derivat des Suizidsubstrats erneut auf Funktionalität getestet, dazu wurde der Aldolase-Antikörper 38C2 mit Hilfe von Natriumperiodat oxidiert und chemisch auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* EBY100-Zellen gekuppelt. Nach Zugabe des biotinylierten Diketons sollte dieses über eine Schiffbase am Antikörper binden und mittels SPE im FACS detektiert werden (Abbildung 4.4.7.). Bei der Analyse der FACS-Daten wurde festgestellt, dass das Substrat nicht gebunden wurde, aber der Antikörper konnte auf der Oberfläche der Hefezellen über eine Immunodetektion mit Hilfe des anti Maus-Biotin Antikörpers und SPE-Färbung nachgewiesen werden. Daraufhin wurde das etwas längere und stabilere Carboxyl-Derivat biotinyliert und über die präparative

HPLC gereinigt. Die korrekte Masse des neuen Substrats (MW=676) wurde mittels LC-MS bestätigt und das Diketon konnte zum *Screening* der SnoaL-Varianten auf der Hefeoberfläche eingesetzt werden.

In Abschnitt 4.5.3. werden die zwei *Screening*-Runden der SnoaL-Muteinbibliothek II gegen das biotinylierte Suizidsubstrat beschrieben. Bei der ersten Sortierung am FACS konnten nach anschließendem *resort* insgesamt ca. 9000 Zellen aussortiert werden. Nach Anzucht und Vermehrung dieser vermeintlich positiven Suizidsubstrat-Binder würde man davon ausgehen, dass nach Induktion bei einer zweiten Sortierungs-Runde bereits einige Zellen nach Markierung mit dem biotinylierten Diketon und anschließender SPE-Färbung im FACS nachzuweisen sind. Dies war jedoch nicht der Fall. Somit wurde auch in der zweiten Sortierungs-Runde der SnoaL-Muteinbibliothek gegen das biotinylierte Suizidsubstrat das Sortierungsfenster so gelegt, dass wiederholt Zellen mit einer relativen Fluoreszenz größer 10 ausgemustert wurden. Obwohl theoretisch nur noch ca. 7000 verschiedene SnoaL-Varianten in der zweiten Sortierungs-Runde vorhanden sein können, wurden über 100-mal mehr Zellen im FACS analysiert. Anhand von Verdünnungsplattierungen konnte nach dem durchgeführten *resort* 2 ermittelt werden, dass ca. 5000 potenzielle Substrat-Binder isoliert wurden. Anschließend wurden aus der zweiten *Screening*-Runde 50 Einzelklone ausgewählt, welche mittels Kolonie-PCR positiv auf das Vorhandensein des SnoaL-Inserts getestet wurden. 30 der positiv getesteten Klone wurden daraufhin nach erfolgreichen Induktionstests mit dem Suizidsubstrat inkubiert und die eventuelle Bindung der SnoaL-Varianten auf der Zelloberfläche mittels anschließender SPE-Färbung im FACS analysiert. Es konnten jedoch keine positiven Zellen detektiert werden. Bei der Analyse der Oberflächenpräsentation der einzelnen SnoaL-Varianten mittels Myc-Färbung wurde festgestellt, dass dieses Epitop nicht markiert werden konnte (Abbildung 4.5.8.). Der Grund dafür war unklar. Da für eine positive Myc-Färbung das vollständige Proteinkonstrukt auf der Oberfläche der Hefezellen präsentiert sein muss, ist es möglich, dass aufgrund von *frame shifts* oder anderen Mutationen die Myc-Färbung negativ ausfiel. Die Hefezellen wurden zusätzlich unter dem Mikroskop auf eventuelle Kontaminationen untersucht. Es konnten jedoch keine gefunden werden.

Zusammenfassend lässt sich in diesem Abschnitt feststellen, dass sich die einzelnen SnoaL-Varianten sowohl löslich, als auch auf der Oberfläche von Bakteriophagen und Hefezellen erfolgreich produzieren ließen. Dennoch konnte trotz der verschiedenen *Screening*-Systeme kein Einzelklon mit einer positiven Aldolase-Aktivität isoliert werden. Möglicherweise ist die Polyketid-Cyclase SnoaL grundsätzlich nicht als Aldol-Katalysator geeignet. Infolgedessen wurde versucht aus VHH-Antikörper Bibliotheken einen Aldol-Katalysator zu isolieren.

5.1.6. DURCHMUSTERUNG VON VHH-ANTIKÖRPER BIBLIOTHEKEN MIT DEM SUIZIDSUBSTRAT AUF DER SUCHE NACH KATALYTISCHEN ALDOLASE-ANTIKÖRPERN

Abschnitt 4.6. handelt von der Durchmusterung von VHH Bibliotheken auf der Suche nach katalytischen Aldolase-Antikörpern. Mit Hilfe von reaktiven Immunisierungen konnten bereits zwei katalytische Antikörper (38C2 und 33F12) mit Klasse-I-Aldolase-Eigenschaft gefunden werden (Barbas III, 1997; Hoffmann, 1998). Dazu wurde ein Diketon als Hapten eingesetzt, welches via Schiffbase eine Reaktion mit den funktionalisierten Aminosäure-Resten im aktiven Zentrum der Antikörper eingeht (Wagner, 1995). Da es sich bei diesen Antikörpern um Immunglobuline handelt, wurde versucht über eine Schiffbasen-Bindung an das Suizidsubstrat einen Schwere-Ketten-Antikörper aus den VHH-Bibliotheken zu isolieren. Obwohl schon viele Substrat-bindende VHHs isoliert werden konnten (Dumuolin, 2003; Koch-Nolte, 2007; Conrath, 2001), ist bislang nur wenig über katalytische VHH-Antikörper in der Literatur zu finden. Die chinesische Forschergruppe an der Xinjiang Universität konnte allerdings einen katalytischen VHH-Antikörper durch Immunisierung eines Lamas und anschließend *Phage-Display-Screening* der cDNA-Bibliothek isolieren (Li, 2012). Bei diesem Schwere-Ketten-Antikörper handelt es sich um einen Alliinase-Katalysator mit einem K_m -Wert von 1,521 mM. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem einer natürlichen Alliinase ($K_m=1,418$ mM) (Li, 2012). Da Schwere-Ketten-Antikörper keine eigentliche Substratbindungstasche besitzen, sondern ihre Enzymbindungen mit der Schleife H3 eingehen (Nguyen, 2001; Desmyter, 1996; Wolfson, 2006) ist es nicht selbstverständlich, dass diese auch eine komplexe Reaktion katalysieren. Allerdings zeigten Müller und Kollegen, dass bereits ein einfaches β -Peptid mit eingebauten Lysinresten als funktionelle Seitengruppen als Klasse I Aldolase agieren kann (Müller, 2009).

Das *Screening* der VHH-Phagenbibliotheken gegen das Suizidsubstrat erfolgte analog zu den SnoaL-Varianten (4.5.2.). Zur Elution der unspezifisch gebundenen Phagen wurde ein pH-*shift* durchgeführt und die gewaschenen *beads* anschließend zur Infektion der *E coli* ER2738 Zellen eingesetzt. Die Wahl fiel auf diese Elutions-Methode, da bei der synthetischen VHH-Bibliothek keine TEV-Protease-Schnittstelle auf dem Phagemid eingebaut ist. Mit beiden Bibliotheken wurden je dreimal vier Phagenamplifikations-Runden gegen das Suizidsubstrat durchgeführt. Die Ergebnisse der Phagentiter sind in Tabelle 4.6.1. dargestellt. Hier konnte zunächst eine Zunahme der jeweiligen Phagentiter von Runde 2 zu Runde 3 beobachtet werden. Zur Analyse der Phagenrunden, wurde ein Western-*blot* gegen das pIII-Protein der Phagen durchgeführt. Anhand der Detektion des pIII-VHH-Fusionsproteins kann man überprüfen, ob das Fusionsprotein auf der Oberfläche der Bakteriophagen exponiert wird. Bei der Auswertung des Western-*blots* wurde festgestellt, dass in den fortgeschrittenen Runden das VHH-pIII-Fusionsprotein verloren gegangen war, ähnlich wie bei den genotypischen Analysen des SnoaL-

pIII-Fusionsgens. Die Gründe hierfür konnten nicht genau geklärt werden. Entweder waren in beiden Bibliotheken keine potenziellen Binder gegen das Suizidsubstrat enthalten, oder es konnte aufgrund des verunreinigten Substrats kein Binder gefunden werden, wodurch sich unspezifische oder degenerierte Phagen, welche nicht durch einen pH-*shift* entfernt werden konnten, angereichert hatten. Bei den anschließenden Tests der Einzelklone aus den jeweils dritten *Screening*-Runden auf die *Retro*-Aldolreaktion oder auf Suizidsubstrat-Bindung konnte kein Klon positiv getestet werden (4.6.1.1.).

Auch beim *Screening* in Abschnitt 4.6.2. der VHH-Bibliothek auf der Oberfläche der *S. cerevisiae* Zellen am FACS konnte kein positiver Substrat-Binder isoliert werden. Wie auch bei der SnoaL-Muteinbibliothek II konnten bei der Durchführung der zweiten Sortierungsrunde keine angereicherten Zellen anhand einer erhöhten Fluoreszenz im FACS detektiert werden. Daraufhin erfolgte auch die zweite Sortierung der Zellen in einem Fenster ab einer relativen Fluoreszenz von 10. Erst bei der zweiten Resortierung (*resort* 2) wurde das Fenster etwas stringenter gesetzt, um vermeintlich stärkere Binder zu isolieren. Bei der Analyse der Genkonstrukte mittels Kolonie-PCR konnten die 50 analysierten Einzelklone positiv getestet werden. Sie zeigten bei FACS-Messungen eine positive Myc-Färbung, was bedeutet, dass die VHHs vollständig auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Jedoch konnte keine Bindung gegen das Suizidsubstrat im FACS detektiert werden (Abbildung 4.5.8.).

Es konnte in diesem Abschnitt nicht gezeigt werden, dass ein VHH-Antikörper auf der Oberfläche von Bakteriophagen oder Hefezellen eine *Retro*-Aldolreaktion katalysiert. Da weder bei den verschiedenen SnoaL-Varianten, noch bei den synthetischen und naiven VHH-Bibliotheken eine Aldolase-Aktivität gezeigt werden konnte, liegt dies möglicherweise auch an den gemeinsam verwendeten Suizidsubstraten. Da die Reinheit der Ausgangsprodukte schon nicht gegeben war, war es umso schwieriger die biotinylierten Substrate aufzureinigen. Die Verwendung solcher Substrate, die leider nicht den höchsten Ansprüchen an Reinheit genügen, ist zwar unbefriedigend, aber unvermeidbar und erschwert zweifelsohne die Isolierung von katalytischen Antikörpern. Die Frage, ob die Bibliotheken von cameliden VHH Antikörpern Varianten enthalten, die den vorgegebenen Ansprüchen an eine Aldolaseaktivität genügen, kann daher nicht abschließend beantwortet werden.

5.1.7. HERSTELLUNG EINES HAPTEN-KONJUGATS MIT DEM SUIZIDSUBSTRAT ZUR IMMUNISIERUNG EINES LAMAS

Da bereits durch reaktive Immunisierungen mittels Suizidsubstrat zwei katalytische Antikörper, 38C2 und 33F12, mit Klasse I-Aldolase-Eigenschaft isoliert werden konnten (Barbas III, 1997;

Hoffmann, 1998), wurde versucht durch die Immunisierung eines Lamas VHH-Antikörper mit gleichen katalytischen Eigenschaften bei unterschiedlichen Ansprüchen zu generieren.

Für die Immunisierung wurde das Carboxyl-Derivat des Diketons (Abbildung 4.4.4.) als Hapten an das Trägerprotein KLH gekoppelt. Voraussetzung für eine gute Immunantwort ist eine hohe Haptendichte am Trägerprotein. KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) ist das am häufigsten zur Immunisierung verwendete Trägerprotein. Die Vorteile des KLH-Proteinkomplexes liegen zum einen in der starken Immunogenität und zum anderen in der großen Anzahl freier, für die Kupplung verfügbarer Aminogruppen (Hoffmann, 1998).

Die Kupplung der freien Carboxylgruppe des Suizidsubstrats (4.4.2.) an den KLH-Proteinkomplex erfolgte wie in Abschnitt 4.7. beschrieben. Die Analyse der Kopplungsreaktion erfolgte über einen ELISA. Bei einer erfolgreichen Kopplung sollte der gekaufte Aldolase-Antikörper 38C2 an das Diketon auf der Oberfläche des KLH-Proteinkomplexes über eine Schiffbase binden. Die Bindung des Antikörpers sollte anschließend über eine Immunodetektion im ELISA nachgewiesen werden. Wie sich jedoch herausstellte, war der Aldolase-Antikörper 38C2 bereits in der Lage an das nicht-kojugierte, solitäre KLH zu binden (Abbildung 4.7.1.). Der Grund dafür war sehr wahrscheinlich, dass bei der Gewinnung von 38C2 KLH auch als Trägerprotein verwendet wurde (Zhong, 1999) und eventuell ein Teil des Antikörpers gegen das KLH gerichtet ist. Daraufhin erfolgte die Analyse der Kupplungsreaktion, ähnlich wie bei der unspezifischen Phagen-Elution, über einen Elutionsschritt mit *pH-shift* (4.7.). Somit sollten nur die Antikörper gebunden bleiben, welche eine Schiffbasen-Bindung mit dem gekoppelten Suizidsubstrat eingehen. In Abbildung 4.7.2. ist das Ergebnis der ELISA-Auswertung der Bindungs-Kontrolle dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass das konjugierte KLH auch nach dem *pH-shift* von dem Aldolase-Antikörper 38C2 gebunden wird (Abbildung 4.7.2. Spur 3 und 4). Die Bindung des Antikörpers an das solitäre KLH-Protein kann durch den *pH-shift* fast vollständig gelöst werden (Abbildung 4.7.2. Spur 2), was man im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle (Spur 1) erkennt. Dass die Absorption der konjugierten KLH-Fractionen nach dem *pH-shift* nicht so stark ist, wie bei der Positiv-Kontrolle (KLH ohne *pH-shift*), liegt aller Wahrscheinlichkeit nach daran, dass auf der großen Oberfläche des KLH-Proteinkomplexes eine Vielzahl an Antikörper-Molekülen binden kann.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Konjugation des Haptens erfolgreich war, wurde eine 1 mg/ml konzentrierte Probe für die Immunisierung des Lamas eingesetzt. Die Ergebnisse der Immunisierung stehen noch aus. Zunächst einmal müsste eine cDNA-Bibliothek der VHH-Antikörper erstellt werden und diese zur Durchmusterung in ein geeignetes *Screening*-System gebracht werden.

5.1.8. AUFBAU EINES FOTOMETRISCHEN ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG DER PRODUKTBILDUNG DER ALDOLASEVARIANTEN

Als Quantifizierungsverfahren der Produktbildung der Aldolase-Varianten, soll ein fotometrischer Assay entwickelt werden. Dazu wird die Cyclopentadecanone-Monooxygenase (CPDMO) eingesetzt. Diese NADPH-abhängige Baeyer-Villiger-Oxidation liefert hierbei die Primärprodukte der Aldol-Cyclisierung, da sie eine besonders hohe Substratspezifität besitzt (Iwaki, 2006).

In Abschnitt 4.8. bestand die Aufgabe zunächst darin, ein stabiles Expressionssystem für die Cyclo-Pentadecanone-Monooxygenase (CPDMO) aufzubauen. Die Schwierigkeiten lagen hierbei in der Reproduzierbarkeit der Expression. Die Bayer-Villiger-Oxygenase konnte anfänglich mit einer Ausbeute von 12,5 mg aus einem Liter Zellkultur mit dem pBAD Expressionsvektor produziert und aufgereinigt werden. Jedoch war diese Ausbeute bei erneuten Produktionen nicht mehr reproduzierbar. Für den Aufbau eines kontinuierlichen Assays zur fotometrischen Quantifizierung der Produktbildung der Aldolasevarianten wurde jedoch ein stabiles und verlässliches Expressionssystem gebraucht. Dazu wurde die CPDMO nach Iwaki, *et al.* (2006) in den pSD80-Vektor kloniert. Die Besonderheit dieses Plasmids ist der *tac*-Promoter. Dieser Promoter ist eine Fusion aus *trp*- und *lac*-Operon. Dabei ist der *tac*-Promoter 3-mal stärker als der *trp*-Promoter und 10-mal stärker als der *lac*-Promoter und somit eine ideale Voraussetzung für Experimente zur Proteinüberexpression (de Boer, 1983). Nach erfolgreicher Klonierung des synthetischen Gens der CPDMO in den pSD80-Vektor konnte bereits bei einer Test-Expression im 500 ml Maßstab eine Proteinausbeute von 26 mg erzielt werden. Dafür wurden *E. coli*-Zellen des Stamms BL21 (DE3) verwendet. Diese transformierten Zellen konnten auch bei wiederholten Versuchen eine ähnlich hohe Proteinausbeute erzielen. Auffällig war die gelbliche Färbung der aufgereinigten und gegen PBS dialysierten Proteinlösung. Vermutlich kam diese Färbung durch den Einbau des Co-Faktors FAD zustande. In der oxidierten Form ist FAD aufgrund der chromophoren Flavin-Gruppe gelb (Michaelis, 1936). Für die weiteren Verwendungen wurde die aufgereinigte Proteinlösung und eine Gefrierkultur der transformierten Zellen an die Arbeitsgruppe von Professor Dr. Fessner (TU-Darmstadt) weiter gereicht.

Es konnte von Dipl. Chem. Thomas Scheidt (AG-Fessner, TU-Darmstadt) gezeigt werden, dass die rekombinant produzierte Monooxygenase in der Lage ist Cyclohexanon, *p*-Phenylcyclohexanon, Cyclopentadecanon, Cyclohexadecanon und Globanon umzusetzen. Das offenkettige 2,15-Hexadecadion, welches in dem kontinuierlichen Assay als Substrat der Aldolase-Varianten dienen soll, wurde nicht unter NADPH-Verbrauch von der CPDMO katalysiert. Daher ist es denkbar, 2,15-Hexadecadion als Substrat zur Quantifizierung der Aktivität vermeintlicher

Aldolase-Varianten einzusetzen (4.8.2.). Dies liegt darin begründet, dass erst, wenn diese den Ringschluss des 2,15-Hexadecadions katalysiert haben, die CPDMO es als Substrat akzeptiert.

5.2. AUSBLICK

Bei Weiterführung dieser Arbeit müsste zunächst die Synthese, Reinigung und Stabilität des biotinylierten Suizidsubstrats weiterhin optimiert werden. Wie gezeigt werden konnte, war es unmöglich, gegen das unaufgereinigte biotinylierte Diketon einen Binder zu isolieren. Da die Durchmusterung auf Bindung dieses Substrats mit mehreren Bibliotheken erfolgte, ist die Qualität des Substrats sehr wahrscheinlich eine erfolgsgestimmende Größe.

Desweiteren wäre es vorteilhaft gewesen, wenn die natürlichen Substrate der Protein-*Scaffolds* zur Verfügung gestanden hätten. So konnte nie überprüft werden, ob die verwendeten Enzyme und deren Varianten aktiv und somit richtig gefaltet vorlagen. Außerdem hätte man mit den natürlichen Substraten testen können, wie sich die eingebauten Lysinreste auf die Enzymaktivität auswirken. Vielleicht hätte man auch Enzyme der Klasse I Aldolasen (z.B. die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (Horecker, 1972)) auf der Oberfläche von Phagen und Hefen exponieren sollen, um diese als Positiv-Kontrollen für die eingesetzten *Screening*-Verfahren zu verwenden. Dadurch hätte optimal getestet werden können in welchen Konzentrationen und unter welchen Bedingungen das biotinylierte Suizidsubstrat hätte eingesetzt werden sollen.

Es ist noch offen, welche Ergebnisse die Immunisierung des Lamas mit dem Suizidsubstrat bringt. Für die Isolierung vermeintlicher Aldolase-Antikörper muss zunächst noch die Blutprobe des Tieres gereinigt und die cDNA daraus isoliert werden. Anschließend steht die Erstellung einer neuen Antikörperbibliothek an. Dabei wäre zu überlegen, ob diese Bibliothek zur Durchmusterung im Hochdurchsatz-Verfahren auf der Oberfläche von Phagen- oder Hefe-Zellen exponiert werden sollte. Das *Phage-Display-Screening* ist auf jeden Fall die aufwändigere Methode und der Verlust des pIII-Fusionsgens war nicht nur in dieser Arbeit eine ungeklärte Begleiterscheinung des *Screening*-Systems. Somit wäre vermutlich die Präsentation der isolierten Antikörper-Varianten auf der Oberfläche von *S. cerevisiae*-Zellen die bessere Wahl. Für die Durchmusterung der einzelnen Zellen am FACS müssten diese zuvor nur mittels Myc-Färbung auf Induktion getestet werden. Da das Lama nicht nur mit dem konjugierten Hapten immunisiert wurde, sondern zusätzlich bei jeder Immunisierung einen Cocktail aus 5 weiteren Antigenen gespritzt wurde, müssten wahrscheinlich mindestens drei Sortierungen gegen das Suizidsubstrat einer Hefe-Bibliothek durchgeführt werden. Wie bei dem gekauften Aldolase-Antikörper gezeigt werden konnte, ist es außerdem notwendig zu kontrollieren, ob mögliche Substratbinder auch gegen den KLH-Proteinkomplex gerichtet sind.

Die Entwicklung eines fotometrischen *Assays* zur Quantifizierung der Produktbildung der Aldolase-Varianten konnte etabliert werden. Dies ist eine wichtige Ansatzstelle, falls bei der Immunisierung des Lamas Binder gegen das Diketon gefunden werden können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, einen experimentellen Zugang zu schaffen, um mit Hilfe eines Klasse I-Aldolase-Mechanismus über eine Schiffbasen-Bildung die Zyklisierung eines linearen Diketons zu bewirken. Dazu wurden zunächst geeignete Proteingerüste ausgewählt, welche in Hinsicht auf der Größe und der Ladungen im Inneren ihrer Substrattasche, in der Lage sein sollten, eine solche Reaktion zu katalysieren. Durch den Einbau von Lysinresten an ausgewählten Aminosäure-Positionen im Inneren des aktiven Zentrums der Proteingerüste sollte die Aldolase-Reaktion über eine Schiffbasen-Bildung initiiert werden. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die eingebauten Lysinreste mit dem Aldol-Marker Methodol reagieren. Da vermutet wurde, dass die installierten Lysinreste im Innern der Substrattasche nicht aktiv waren, wurden Aminosäuren in der näheren Umgebung der Lysinreste mit dem *PyMOL*-Programm in einem Substratspezifischen Radius von 9 Å ausgesucht und über SOE-PCR mit degenerierten *Primern* die randomisierten Stellen eingebaut. Durch den Einfluss der zufällig eingebauten Aminosäuren sollten die installierten Lysinreste aktiviert werden. Zur Identifizierung aktiver Lysinreste wurden mehrere Muteinbibliotheken auf der Basis des Proteingerüsts der Polyketid-Cyclase *SnoaL* erstellt. Es wurden *Display*-Verfahren etabliert und die *SnoaL*-Muteinbibliotheken im Hochdurchsatz-Verfahren durchmustert. Für die Durchmusterung im Hochdurchsatz-Verfahren wurden sogenannte Suizid-Substrate synthetisiert, welche mit dem funktionellen Lysinrest über eine Schiffbase eine kovalente Bindung eingehen und somit als Marker für eine Klasse I Aldolase-Reaktion fungieren können. Es traten jedoch große Schwierigkeiten bei der Reinigung dieser Substrate auf. Außerdem mussten die Diketon-Derivate für den Einsatz des *High-Throughput-Screenings* durch die Kopplung eines Biotin-Linkers funktionalisiert werden. Auch hier erwies sich die Trennung der eingesetzten Edukte von dem gewünschten Produkt als äußerst schwierig und Letztere zeigten außerdem eine geringe Stabilität selbst bei -20 °C.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Isolation katalytischer Aldolase-Antikörper aus einer synthetischen und einer naiven VHH-Bibliothek. Aber auch aus diesen Bibliotheken konnte kein Substrat-Binder isoliert werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass mit Hilfe eines Hapten-Konjugats aus Diketon-Derivat und KLH durch Immunisierung mehrere Aldolase-Antikörper isoliert wurden (Barbas, 1997; Zhong, 1999), wurde diese Methode ebenfalls zur Gewinnung katalytischer Antikörper herangezogen. Da nach katalytischen Schwere-Ketten-Antikörpern gesucht wurde, erfolgte die Immunisierung eines Lamas mit dem Suizidsubstrat als Hapten-Konjugat.

Wenn auch die Isolierung von *SnoaL*-Varianten oder VHH Antikörpern mit Aldolase-Aktivität nicht erfolgreich war, wurden Möglichkeiten und Grenzen bezüglich Enzymgrundgerüst,

Display-Strategie, Durchmusterungsverfahren und Substratsynthese ausgelotet, die eine Risikobewertung und Kalkulation der Erfolgswahrscheinlichkeit künftiger, ähnlich gelagerter Produkte wesentlich erleichtern dürfte.

Zusätzlich wurde für die spätere Quantifizierung der Produktbildung der Aldolase-Varianten ein kontinuierlicher *Assay* etabliert, bei dem mit Hilfe einer Cyclopentadecanone-Monooxygenase (CPDMO) ein Cofaktor-abhängiges, an die Produktbildung gekoppeltes Signal detektiert werden kann. Dafür konnte ein stabiles und reproduzierbares Expressionssystem aufgebaut werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Axel, R.** (1995): The Molecular Logic of Smell; *Scientific American*, 130-137.
- Azzazy, H. M. and Highsmith, W. E.** (2002): Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem.*, **35**, 425-445.
- Baker, P. and Seah, S. Y. K.** (2012): Rational Design of Stereoselectivity in the Class II Pyruvate Aldolase BphI. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 507–513.
- Barbas III, C. F., Burton, D., R., Scott, J., K., Silverman, G., J.** (2004): Phage Display: A Laboratory Manual; *CSHL Press*, 736.
- Barbas III, C. F., Heine, A., Zhong, G., Hoffmann, T., Gramatikova, S., Björnstedt, R., List, B., Anderson, J., Stura, E. A., Wilson, I. A., Lerner, R. A.** (1997): Immune versus natural selection: Antibody aldolases with enzymatic rates but broader scope. *Science*. **278**, 2085-2092.
- Benatuil, L., Perez, J. M., Belk, J., Hsieh, C.-M.** (2010): An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. *Protein Engineering Design and Selection*, **23**(4), 155–159.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J., Gotschlich, E. C.** (1984): A Rapid, Sensitive Method for Detection of Alkaline Phosphatase-Conjugated AntiAntibody on Western Blots, *Anal Biochem*, **1**, 175-9.
- Bloom, J. D. and Arnold, F. H.** (2009): Colloquium Papers: In the light of directed evolution: Pathways of adaptive protein evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 9995–10000.
- Boder, E.T. and Wittrup, K.D.** (1997): Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*, **15**(6), 553–557.
- Bornscheuer, U. T. and Pohl, M.** (2001): Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol*, **5**(2), 137–143.
- Borschberg, H.-J.** (1995): Beispiel Naturstoffchemie: Von der Bedeutung der Grundlagenforschung; *ETH Bulletin* Nr. 256.
- Bradley, P., Misura, K. M. S., Baker, D.** (2005): Toward High-Resolution de Novo Structure Prediction for Small Proteins. *Science*. **309**(5742), 1868-1871.

Brauckmann, B. (1994): Der Natur auf der Spur und Geschäft mit flüchtigem Luxus; *Chemische Rundschau*.

Brauckmann, B. (1998): Vom indonesischen Blumenmarkt in den Parfümflakon; *Roche Facetten* 3.

Brauckmann, B. (1998): Wie sichergestellt wird, dass ein Deodorant wirklich nicht versagt; *Roche Facetten* 4.

Breitmeier, E. (1999): Terpene, *Teubner Studienbücher, Stuttgart, Leipzig*.

Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., Craig, E. A. (2000): Getting newly synthesized proteins into shape, *Cell*, **101**, 119-122.

Cane, D. E. and Kang, I. (2000): Aristolochene Synthase: Purification, Molecular Cloning, High-Level Expression in *Escherichia coli*, and Characterization of the *Aspergillus terreus* Cyclase; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; **376**(2), 354-364.

Cane, D. E. and Bryant, C. (1994): Aristolochene Synthase: Mechanism-Based Inhibition of a Terpenoid Cyclase; *J. Am. Chem. Soc.*, **116**(26), 12063-12064.

Carter, Jr. C. W., Baldwin, E. T., Frick, L. (1986): Statistical design of experiments for protein crystal growth and the use of a precrystallization assay. *Journal of Crystal Growth*, **90**, 60-73.

Caruthers, J. M., Kang, I., Rynkiewicz, M. J., Cane, D., E., Christianson, D. W. (2000): Crystal Structure Determination of Aristolochene Synthase from the Blue Cheese Mold, *Penicillium roqueforti*; *J. Biol. Chem*, **275**(33), 25533-25539.

Choi, K. H., Mazurkie, A. S., Morris, A. J., Utheza, D., Tolan, D. R., Allen, K. N. (1999): Structure of a fructose-1,6-bis(phosphate) aldolase liganded to its natural substrate in a cleavage-defective mutant at 2.3 Å. *Biochemistry*, **38**, 12655-64.

Conrath, K. E., Lauwereys, M., Galleni, M., Matagne, A., Frère, J. M., Kinne, J., Wyns, L., Muyldermans, S. (2001): Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in *Camelidae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2807-2812.

Dalby, A., Dauter, Z., Littlechild, J. A. (1999): Crystal structure of human muscle aldolase complexed with fructose 1,6-bisphosphate: mechanistic implications. *Protein Sci.*, **8**, 291-7.

de Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M. (1983): The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 21-25.

-
- Deng, S. J., MacKenzie, C. R., Sadowska, J., Michniewicz, J., Young, N. M., Bundle, D. R., Narang, S. A.** (1994): Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. *J. Biol. Chem.*, **269**, 9533–9538.
- Desmyter, A., Transue, T. R., Ghahroudi, M. A., Thi, M. H., Poortmans, F., Hamers, R., Muyldermans, S., Wyns, L.** (1996): Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 803–811.
- Dietrich, B., Viout, P., Lehn, J.-M.** (1993): *Macrocyclic Chemistry, VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge.*
- Dolk, E., van der Vaart, M., Lutje, D., Hulsik, M., Vriend, G., de Haard, H., Spinelli S., Cambillau C., Frenken, L., Verrips, T.** (2005): Isolation of Llama Antibody Fragments for Prevention of Dandruff by Phage Display in Shampoo; *Appl Environ Microbiol.* **71**(1), 442–450.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C.W.** (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127–6145.
- Downey, N.** (2003): Extraction of DNA from Agarose Gels, *Methods Mol Biol*, 137–9.
- Du J., Say, R. F., Lü W, Fuchs, G., Einsle, O.** (2011): Active-site remodelling in the bifunctional fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase. *Nature.*; **478**(7370), 534–7.
- Dumoulin, M., Last, A. M., Desmyter, A., Decanniere, K., Canet, D., Larsson, G., Spencer, A., Archer, D. B., Sasse, J., Muyldermans, S., Wyns, L., Redfield, C., Matagne, A., Robinson, C. V., Dobson, C. M.** (2003): A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature* **424**, 783–788.
- Engvall, E. and Perlman, P.** (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.: *Immunochemistry.* **8**, 871–874.
- Fessner, W.-D.** (2000) In *Stereoselective Biocatalysis* (Ed: Patel, R. N.), Marcel Dekker, New York, 239–265.
- Fessner, W.-D.** (2003): Are Paradigms Changing in Favor of Biocatalysis?, *Adv. Synth. Catal* **345**, 649–650.
- Fessner, W.-D.** (2004): Enzyme-catalysed Aldol Reaktionen, *Modern Aldol Reaktionen, Wiley-VCH, Weinheim*, 201–272.
- Gautschi, M., Bajgrowicz, J., Kraft, P.** (2001): Fragrance Chemistry-Milestones and Perspectives; *Chimia*, **55**, 379–387.
-

Greenberg, A. S., Avila, D., Hughes, M., Huges, A., McKinney, E. C., Flajnik, M. F. (1995): A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*. **374**, 168-173.

Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., Beckwith, J. (1995): Tight regulation, modulation and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121-4130.

Haarmann and Reimer Edition (1991): "Das HR Buch Parfüm"; Glöss Verlag Hamburg 1991.

Habicht G. Haupt, C., Friedrich, R. P. (2007): Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**(49), 19232-7.

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendman, N., Hamers, R. (1993): Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. **363**, 446-448.

Harmsen M. M. and De Haard H. J. (2007): Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments; *Appl Microbiol Biotechnol.* **77**(1), 13-22.

Heck R. F., Negishi E. and Suzuki A. (2011) The Nobel Prize in Chemistry "for palladium-catalyzed cross couplings in organic synthesis".

Hoffmann, T.; Zhong, G. F.; List, B.; Shabat, D.; Anderson, J.; Gramatikova, S.; Lerner, R. A.; Barbas III, C. F. (1998): Aldolase antibodies of remarkable scope. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2768-2779.

Hoffmann, T.; Zhong, G. F.; List, B.; Shabat, D.; Anderson, J.; Gramatikova, S.; Lerner, R. A.; Barbas III, C. F. (1998): Aldolase antibodies of remarkable scope. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2768-2779.

Horecker, B. L., Tsolas, O., Lai, C. Y. (1972): Aldolases, *The Enzymes*, Vol. VII, (Ed: Boyer, P. D.), Academic Press, New York, 213-258.

Horton, R.M.; Hunt, H.D.; Ho, S.N.; Pullen, J.K.; Pease, L.R. (1989): Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**(1), 61-68.

Houben-Weyl (1999): Methoden der organischen Chemie, Bd. **4**(2), 729-815.

Iwaki, H., Wang, S., Grosse, S., (2006): Pseudomonad Cyclopentadecanone Monooxygenase Displaying an Uncommon Spectrum of Baeyer-Villiger Oxidations of Cyclic Ketones *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(4), 2707-2720.

Janda, K. D., Lo, C.-H. L., Li, T., Barbas III, C. F. 3, Wirsching, P., Lerner, A. R. (1994): Direct selection for a catalytic mechanism from combinatorial antibody libraries. *PNAS*, **91**, 2532-2536.

Jellinek, J. S. (1998): Die Geburt des modernen Parfüms in *Dragoco Report* **3**.

Jenks, W. P. (1969): Strain distortion and catalysis In: Catalysis in chemistry and Enzymology, *McGraw-Hill, New York*, 288-289.

Johnsson, K., Allemann, R. K., Widmer, H., Benner, S. A. (1993): Synthesis, structure and activity of artificial, rationally designed catalytic polypeptides. *Nature*. **365**, 530-532.

Jung, S. and Plückthun, A. (1997): Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. *Protein Eng.* **10**, 959–966.

Kallio, P., Sultana, A., Niemi, J., Mäntsälä, P., Schneider G. (2006): Crystal structure of the polyketide cyclase AklH with bound substrate and product analogue: implications for catalytic mechanism and product stereoselectivity. *J Mol Biol.* **357**(1), 210-20.

Koch-Nolte, F., Reyelt, J., Schossow, B., Schwarz, N., Scheuplein, F., Rothenburg, S., Haag, F., Alzogaray, V., Cauerhff, A., Goldbaum, F. A. (2007): Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADPribosyltransferase ART2.2 in vivo. *Faseb. J.*, **21**, 3490-3498.

Kraft, P., Bajgrowicz J. A., Denis C., Fráter G. (2000): Allerlei Trends: die neuesten Entwicklungen in der Riechstoffchemie. *Angewandte Chemie*. **112** (17), 3106-3138.

Kramer, R. A., Cox F., van der Horst, M., van den Oudenrijn, S., Res, P. C. M., Bia, J., Logtenberg, T., de Kruif, J. (2003): A novel helper phage that improves phage display selection efficiency by preventing the amplification of phages without recombinant protein, *Nucleic Acids Research*, **31**, 11-59.

Krebber, A., Burmester, J., Plückthun, A. (1996): Inclusion of an upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p. *Gene*. **178**, 71–74.

Kuhlich, P., Göstl, R., Teichert, P., Piechotta, C., Nehls, I. (2011): Transformations of polycyclic musks AHTN and HHCB upon disinfection with hypochlorite: two new chlorinated disinfection

by-products (CDBP) of AHTN and a possible source for HHCB-lactone; *Anal Bioanal Chem*, **399**, 3579–3588.

Kunkel, T.A. (2001): Oligonucleotide-Directed Mutagenesis without Phenotypic Selection.; *Thomas A. Kunkel, Ed.; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA*, 2001.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **5259**, 680-5.

Langley, K.E., Berg, T. F., Strickland, T. W., Fenton, D. M., Boone, T. C., Wypych. J. (1987): Recombinant-DNA-derived bovine growth hormone from *E. coli*. 1. Demonstration that the hormone is expressed in reduced form, and isolation of the hormone in oxidized, native form. *Eur. J. Biochem.*, **163**, 313-321.

Lesburg, C., A., Zhai, G., Cane, D., E., Christianson, D., W. (1997): Crystal Structure of Pentalene Synthase: Mechanistic Insights on Terpenoid Cyclization Reactions in Biology; *Science*; **277**(5333), 1820–1824.

Li, J.-W., Xia, L., Su, Y., Liu, H., Xia, X., Lu, Q., Yang, C. K. R (2012): Molecular imprint of the enzyme active site by camel nanobodies: a rapid and efficient approach to produce abzymes with alliinase activity. *JBC Papers in Press*.

List, B., Barbas III, C. F., Lerner, R. A. (1998): Aldol sensors for the rapid generation of tunable fluorescence by antibody catalysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 15351-15355.

Lutz S., Patrick W. P. (2004): Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**(4), 291–297.

Meyer, T. S. and Lamberts, B. L. (1965): Use of Coomassie Brilliant Blue R250 for the Electrophoresis of Microgram Quantities of Parotid Saliva Proteins on AcrylamideGel Strips, *Biochim Biophys Acta*, **1**, 144-5.

Michaelis, L., Schubert, M. P., Smythe, C. V. (1936): Potentiometric Study of the Flavins. *J. Biol. Chem.* **116**(2), 587–607.

Middleton, J., Neil, S., Wintle J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer M., Hub, E., Rot, A. (1997): Transcytosis and Surface Presentation of IL-8 by Venular Endothelial Cells. *Cell*, **91**(3), 385-395.

-
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H., Bukau, B.** (1999): Identification of thermolabile E. coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB, *EMBO J.* **18**, 6934-6949.
- Müller, M. M., Windsor M. A., Pomerantz W. C., Gellman S. H., Hilvert D.** (2009): A Rationally Designed Aldolase Foldamer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 922 –925.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987): Specific Synthesis of DNA in Vitro Via a Polymerase Catalyzed Chain Reaction, *Methods Enzymol*, 335-50.
- Mutschler, E., Spahn, H., Mühlberg, W., Platt, D.** (1986): "Age-dependent pharmacokinetics of atenolol in patients with multiple diseases" 'Drugs and Aging' D. Platt, Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
- Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Babosa, J. A., Hamers, R.** (1994): Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* **7**, 1129-1135.
- Nguyen, V. K., Hamers, R., Wyns, L., Muyldermans, S.** (1999): Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol* **36**, 515-524.
- Nguyen, V.K., Desmyter, A., Muyldermans, S.** (2001): Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv Immunol* **79**, 261-295.
- Nunn, C. M., Jeeves, M.** (2005): Crystal Structure of Tobacco Etch Virus Protease Shows the Protein C Terminus Bound within the Active Site, *J Mol Biol*, **1**, 145-55.
- Ohloff, G.** (1990): Riechstoffe und Geruchssinn, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1990.
- Pabo, C.** (1983): Molecular technology. Designing proteins and peptides. *Nature*. **301**, 200.
- Padlan, E.** (1994): Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol*, **3**, 169–217.
- Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A., Dougherty, W. G.** (1994): Release of Proteins and Peptides from Fusion Proteins Using a Recombinant Plant Virus Proteinase, *Anal Biochem*, **2**, 413-7.
- Phan, J., Zdanov, A., Evdokimov, A. G., Tropea, J. E., Peters, H. K. 3rd, Kapust, R. B., Li, M., Wlodawer, A., Waugh, D. S.** (2002): Structural Basis for the Substrate Specificity of Tobacco Etch Virus Protease, *J Biol Chem*, **52**, 50564-72.
-

-
- Porath, J. and Olin B.** (1983): Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*. **22**, 1621-30.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G.** (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*. **258**, 598-9.
- Pritchard, L., Corne, D., Kell, D., Rowland, J., Winson, M.** (2005): A general model of error-prone PCR. *J Theor Biol*. **234**, 497-509.
- Proctor, R. H. and Hohn, T. M.** (1993): Aristolochene synthase. Isolation, characterization, and bacterial expression of a sesquiterpenoid biosynthetic gene (Ari1) from *Penicillium roqueforti*; *J. Biol. Chem.*, **268**(6), 4543-4548.
- Rabenhorst** (2007): Symrise: Projekt "Makrozyklische Moschusriechstoffe".
- Rast, J. P., Ameyia, C. T., Litman, R. T., Strong, S. J., Litman, G. W.** (1998). Distinct patterns of IgH structure and organization in a divergent lineage of chondrichthyan fishes. *Immunogenetics* **47**, 234-245.
- Rebmann, A., Wauschkuhn, C., Waizenegger, W.** (1998): Bedeutung der Moschusduftstoffe im Wandel der Zeit, *Dragoco Report*, **2**/1998.
- Reetz M. T., Bocola M., Carballeira J. D., Zha D., Vogel A.** (2005): Expanding the Range of Substrate Acceptance of Enzymes: Combinatorial Active-Site Saturation Test. *Angewandte Chemie*. **117**, 4264-4268.
- Renart, J., Reiser, J.** (1979): Transfer of Proteins from Gels to DiazobenzyloxymethylPaper and Detection with Antisera: A Method for Studying Antibody Specificity and Antigen Structure, *Proc Natl Acad Sci USA*, **7**, 3116-20.
- Reymond J.-L.** (2006): Artificial aldolases from peptide dendrimer combinatorial libraries. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 3268-3281.
- Richardson, J.S., Richardson, D.C.** (1998): The de novo design of protein structures. *Trends Biochem. Sci*, **14**(7), 304–309.
- Russel, M., Lowman, H.B., Clackson, T.** (2004): Introduction to phage biology and phage display. in *Phage Display: A Practical Approach.*, *Oxford University Press, New York, USA*, 1–26.
- Ruzicka L.** (1926): Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes VII. Über die Konstitution des Muscons. *Helv. Chim. Acta*, **9**, 715-729.
-

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R. (1988): PrimerDirected Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase, *Science*, **4839**, 487-91.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985): Enzymatic Amplification of BetaGlobin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia, *Science*, **4732**, 1350-4.

Saphire, E. O., Parren P. W. H. I., Pantophlet R., Zwick, M. B., Morris, G. M., Rudd P. M., Dwek R. A., Stanfield R. L., Burton D. R., Wilson I. A. (2001): Crystal Structure of a Neutralizing Human IgG Against HIV-1: A Template for Vaccine Design, *Science*. **293**(5532), 1155-1159.

Schägger, H. (2006): Tricine Sds Page, *Nat Protoc*, **1**, 16-22.

Schägger, H. and von Jagow, G. (1987): TricineSodium Dodecyl SulfatePolyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 Kda, *Anal Biochem*, **166**, 368-79.

Seemann M., Zhai G., Kraker JW de, Paschall C.M., Christianson D. W., Cane D. E. (2002): Pentalenene synthase: Analysis of active site residues by site-directed mutagenesis. *Journal of the American Chemical Society*; **124**(26),7681-9.

Seiffert, C. (2000): Die Phänologie des Duftes, *Dragoco Report* **2**, 56-67.

Shiroishi, M., Yokota, A., Tsumoto, K., Kondo, H., Nishimya, Y., Horii, K., Matsushima, M., Ogasahara, K., Yutani, K., Kumagai, I. (2001): Structural evidence for entropic contribution of salt bridge formation to a protein antigenantibody interaction: the case of hen lysozyme-HyHEL-10 Fv complex. *J Biol Chem* **276**, 23042-23050.

Siegel, J. B., Zanghellini, A., Lovick, H. M., Kiss, G., Lambert, A. R., St.Clair, J. L., Gallaher, J. L., Hilvert, D., Michael, F. E., Baker, D. (2010): Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. *Science*. **329**. 309-313.

Siegel, J. B., Eiben, C. B., Bale, J., Foldit, P., Khatib, F., Cooper, S., Shen, B. W., Stoddard, B. L., Popovic, Z., Baker, D. (2012): Increased Diels-Alderase activity through FoldIt player guided backbone remodeling. *Nature Biotechnology*. **10**, 1038-2109.

Smiley, J. A. and Benkovic, S. J. (1994): Selection of catalytic antibodies for a biosynthetic reaction from a combinatorial cDNA library by complementation of an auxotrophic *Escherichia coli*: Antibodies for orotate decarboxylation. *PNAS*, **91**, 8319-8323.

Smith, S. P., Barber, K. R., Dunn, S. D., Shaw, G. S. (1996): Structural influence of cation binding to recombinant human brain S100b: evidence for calcium-induced exposure of a hydrophobic surface. *Biochemistry*. **35**, 8805–8814.

Stemmer, W. P. (1994): DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**, 10747-10751.

Strelsov, V. A., Varghese, J. N., Carmichael, J. A., Irving, R. A., Hudson, P. J., Nuttal, S. D. (2004): Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 12444-12449.

Studier, F. W. and Moffatt B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*. **189**, 113-30.

Sultana, A., Kallio, P., Jansson, A., Wang, J., Niemi, J., Mäntsälä, P., Schneider, G. (2004): Structure of the polyketide cyclase Snoal reveals a novel mechanism for enzymatic aldol condensation; *The EMBO Journal*; **23**, 1911 – 1921.

Swanson, J., Mayer, L. W., Tam, M. R. (1982): Antigenicity of Neisseria Gonorrhoeae Outer Membrane Protein(S) Iii Detected by Immunoprecipitation and Western Blot Transfer with a Monoclonal Antibody, *Infect Immun*, **2**, 668-72.

Taylor, M. S. and Called-Spong, A. (1997): CoAmplification of the Amelogenin and Hla Dq Alpha Genes: Optimization and Validation, *J Forensic Sci*, **1**, 130-6.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **9**, 4350-4.

Tracewell, C.A. and Arnold, F.H. (2009): Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Current Opinion in Chemical Biology*, **13** (1), 3-9.

Tramontano, A., Janda, K. D., Lerner, R. A (1998): Catalytic antibodies. *Science* **234**, 1566-1570.

Ulmer, K.M. (1983): Protein engineering. *Science*. **219**, 666-671.

Van der Linden, R., De Geus, B., Stok, W., Bos, W., Van Wassennar, D., Verrips, T., Frenken, L. (2000): Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J Immunol Methods* **240**, 185-195.

-
- Verlinde, C. L. M. J., Quigley, P. M.** (1999): Structure-based reevaluation of the mechanism of class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Mol. Biol.* **5**, 37-45.
- Villaverde, A. and. Carrio, M. M.** (2003): Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett*, **25**(17), 1385-95.
- Vu, K. B., Ghahroudi, M. A., Wyns, L., Muyldermans, S.** (1997): Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol*, **34**, 1121-1131.
- Vögtle, F.** (1972): Das Verdünnungsprinzip, Aspekte und Anwendungen, III1: Einstufen-Synthese vielgliedriger Metacyclophane. *Synthesis. - Stuttgart : Thieme*, **9**, 480-480.
- Wagner, J.; Lerner, R. A.; Barbas III, C. F.** (1995): Efficient aldolase catalytic antibodies that use the enamine mechanism of natural enzymes. *Science*, **270**, 1797-1800.
- Walter, C.** (1996): »Chemische und enzymatische C-C Verknüpfung in wässrigem Medium« Dissertation, RWTH Aachen.
- Westheimer, F. H.** (1995): Coincidences, decarboxylation, and electrostatic effects. *Tetrahedron*, **51**, 3-20.
- Weston C. J., Cureton C. H., Calvert M. J., Smart O. S., Allemann R. K.** (2004): A Stable Miniature Protein with Oxaloacetate Decarboxylase Activity. *ChemBioChem*. **5**, 1075-1080.
- Wilson, D. R. and Finlay, B. B.** (1998): Phage display: applications, innovations and issues in phage and host biology. *Can. J. Microbiol.* **44**, 313-329.
- Wirsching, P., Ashley, J. A., Lo, C.-H., Janda, K. J., Lerner, R. A.** (1995): Reactive immunization. *Science*, **270**, 1775-1782.
- Wolfson W.** (2006): Ablynx Makes Nanobodies from Llama Bodies. *Chem Biol.* **13**, 1243-1244
- Woolven, B. P., Frenken, L. G., Van der Logt, P., Nicholls, P. J.** (1999): The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavychain antibody formation. *Immunogenetics*, **50**, 98-101.
- Wurtz, C.-A.** (1872): Aldol-Reaktion, *Annales de chimie et de physique*.
- Yang, G. and Withers, S. G.** (2009): Ultrahigh-throughput FACS-based screening for directed enzyme evolution. *Chembiochem*, **10**(17), 2704-2715.
- Zhong, G., Lerner, R. A and Barbas III, C. F.** (1999): Erweiterung des Repertoires von katalytischen Antikörpern mit Aldolaseaktivität durch Kombination von reaktiver
-

Immunisierung und Übergangszustandstheorie: neue Enantio- und Diastereoselektivitäten. *Angew. Chem.* **111**(24), 3957-3960.

Zhong, G., Shabat, D., List, B., Anderson, J., Sinha, S. C., Lerner, R. A., Barbas III, C. F. (1998): Katalytische enantioselektive Retro-Aldolreaktion: kinetische Racematspaltung von β -Hydroxyketonen durch Aldolase-Antikörper. *Angew. Chem.* **110**, 2609-2612.

8. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Harald Kolmar, der mir durch die Bereitstellung des interessanten Themas, die angenehme Betreuung und das mir entgegen gesetzte Vertrauen diese Arbeit ermöglicht hat. Desweiteren danke ich Dr. Andreas Christmann, der mich immer kompetent und ehrlich betreut hat. Herrn Prof. Dr. Heribert Warzecha danke ich für die Übernahme des Korreferats. Herrn Professor Wolf-Dieter Fessner, Thomas Scheidt und Deniz Güclü danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Suizid-Substrate.

Der gesamten AG Kolmar danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die tolle Zusammenarbeit auf engstem Raum und das tägliche Training am Kicker. Besonders danke ich Janine für ihre Freundschaft und alles was wir in der ganzen Zeit erlebt haben. Thomas danke ich für unzählige Biere und den ganzen Spaß den wir zusammen hatten. Niklas und Marc danke ich für tiefe Einblicke einer Cola-Flasche – ich denke jeden morgen an euch. Fabi danke für deine Schulter zum draufhauen. Stefan danke ich für die musikalischen Aufmunterungen im Labor. Tim danke ich für die vielen hilfreichen Worte bei jeder Art von Problemen. Sebastian (Hörner) danke für deine Hilfsbereitschaft. Barbara danke ich für die stets freundliche Unterstützung bei allem Bürokratismus. Björn danke ich für die schöne gemeinsame Zeit im Labor und zu Hause. Und Michael – danke für deine Hilfe bei dem Chemiezeug!

Ich danke meiner Familie für ihre Unterstützung und dafür, dass alle immer an mich geglaubt haben. Tack så mycket.

Sascha Griebenow danke ich für die liebevolle und ehrliche Unterstützung in unserer gemeinsamen Zeit.

Und Benedikt Mattheus danke ich für die Ablenkung und Aufmunterung in der Zeit, als ich wirklich keine Lust mehr hatte.

9. ANHANG

9.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| A | Adenin |
| Å | Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$) |
| Abb. | Abbildung |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat |
| bidest. | zweifach destilliert |
| <i>bla</i> | β-Laktamase-Gen |
| BN | <i>Blue native</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserum-Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| CDR | <i>Complementarity Determining Region</i> |
| CPDMO | Cyclopentadecanone-Monooxygenase |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| ca. | circa |
| Da | Dalton |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| dYT | <i>double Yeast Tryptone</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| FACS | <i>Fluorescent activated cell sorter</i> |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| GFC | Gelfiltrationschromatographie |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |

| | |
|-----------------|--|
| h | Stunde |
| HPLC | <i>highpressure/performance liquid chromatography</i> |
| IMAC | <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i> |
| IPTG | Isopropyl-®-D-thiogalactopyranosid |
| k | Kilo (10^3) |
| kb | Kilobasen |
| KGaA | Kommanditgesellschaft auf Aktien |
| Km | Kanamycin |
| l | Liter |
| LB | <i>lysogeny broth</i> |
| m | Milli (10^{-3}) |
| M | Molar (Mol/Liter) |
| mA | Milliampere |
| min | Minute |
| mm | Millimeter |
| mol | Mol |
| M_r | relatives Molekulargewicht |
| MW | <i>Molecular Weight</i> |
| MWCO | <i>Molecular Weight CutOff</i> |
| n | Nano (10^{-9}) |
| N-Terminus | Aminotерminus |
| NBT | Nitroblautetrazoliumchlorid |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| OD _x | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm |
| ori | Replikationsursprung |
| p | Pico (10^{-12}) |
| <i>p.A.</i> | <i>pro analysis</i> |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> (-Puffer) |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur (~20°C) |
| s | Sekunde |
| SDS | <i>Sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat |

| | |
|-------|---|
| SPE | Streptavidin-Phycoerithrin |
| SV | Säulenvolumen |
| T | Thymin |
| t | Zeit |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | <i>TrisAcetatEDTA</i> -(Puffer) |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TEV | <i>Tobacco Etch Virus</i> |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan |
| U | Einheit, <i>unit</i> |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VHH | <i>Variable heavy chain of a heavy chain antibody</i> |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| Vol. | Volumen |
| W | Watt |
| z.B. | zum Beispiel |

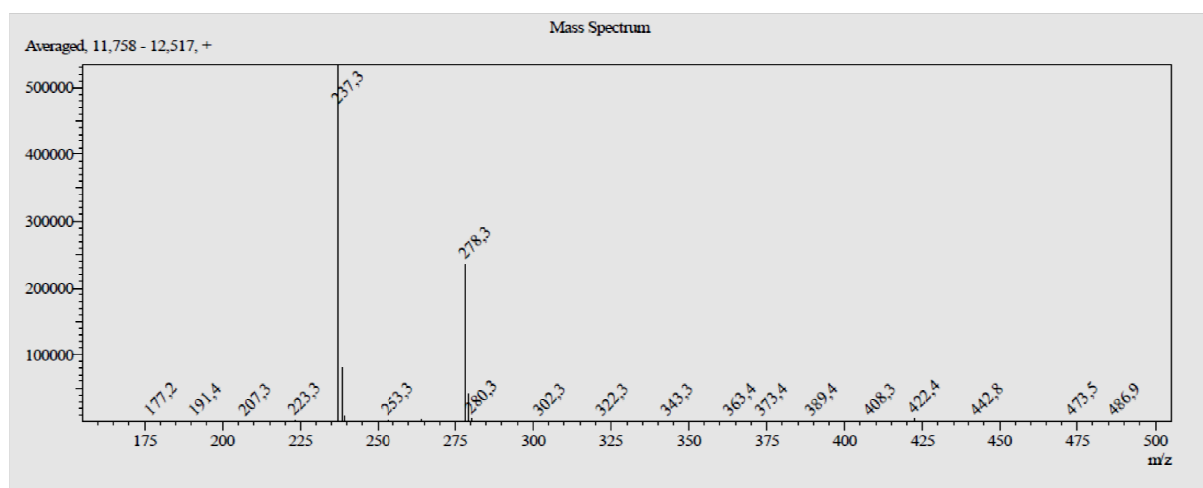
9.2. SEQUENZEN

Aminosäure-Sequenzen der 10 zufällig ausgewählten Einzelklone aus der SnoaL-Phagenbibliothek basierend auf der SnoaL-Lysinvariante V55K. Der Einbau der Mutationen erfolgte an den Positionen F48, L51, F59 und A63 (siehe 4.3.1.).

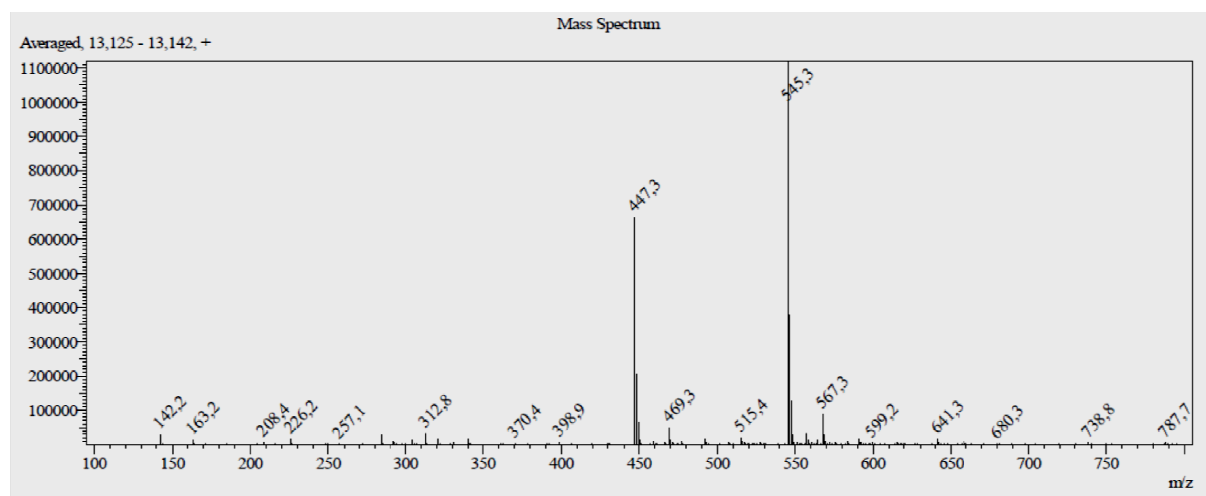
- **SnoaLV55K** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**FAQLV**
- **K11** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**SAQM**V
- **K12** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**FAQSV**
- **K13** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**SAQKV**
- **K14** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**HAQEV**
- **K15** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**LAQKV**
- **K16** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**RAQQV**
- **K17** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**TAQXV**
- **K18** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**LAQLV**
- **K19** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**PAQTV**
- **K20** RQTEIVRRMV SAFNTGRTDD VDEYIHPDYL NPATLEHGIH TGPKA**SAQRV**
-
- **SnoaLV55K** GWKRAT**F**SEE **AR**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS
- **K11** GWKRAT***S**ED **XR**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS
- **K12** GWKRAT**L**SEE **LR**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS
- **K13** GWKRAT**E**SEE **ER**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS
- **K14** GWKRAT**N**SEE **ER**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS
- **K15** GWKRAT**W**SEE ***R**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS
- **K16** GWKRAT**M**SEE **VR**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS
- **K17** GWKRAT**X**SEE **XR**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS
- **K18** GWKRAT**L**SEE **MR**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS
- **K19** GWKRAT**G**SEE **WR**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS
- **K20** GWKRAT**G**SEE **MR**LEEVRIEE RGPWVKAYLV LYGRHVGR LV GMPPTDRRFS

9.3. MASSENSPEKTREN

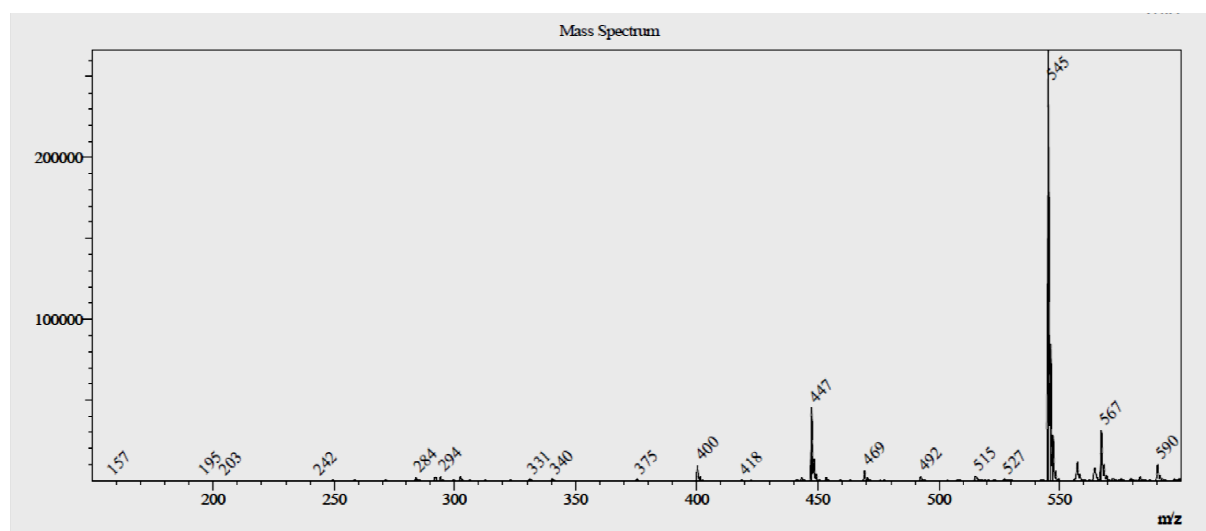
Massenspektrum zu Abbildung 4.4.2.A:



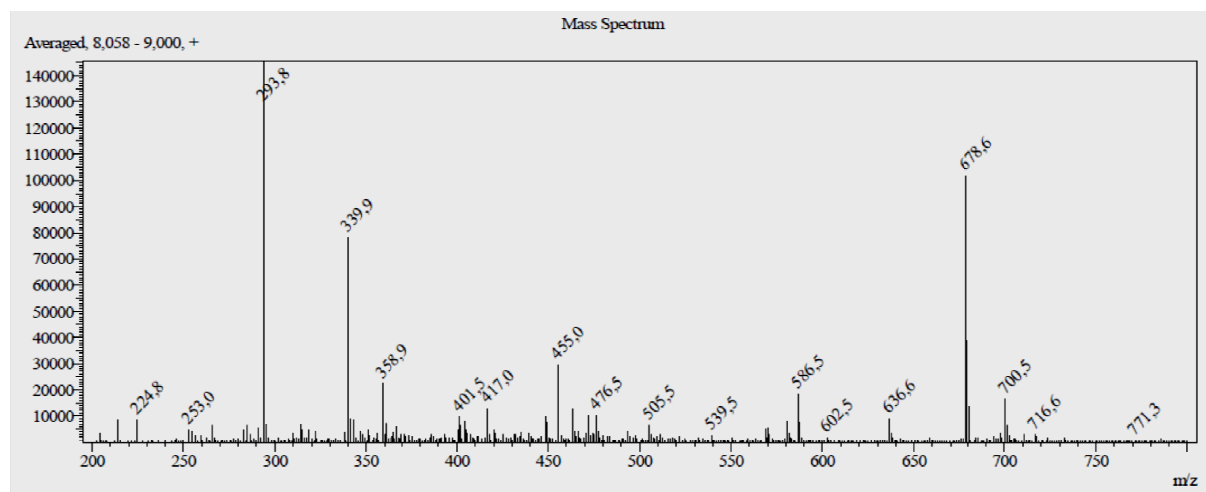
Massenspektrum zu Abbildung 4.4.2.B (Biotinylierung des 6-(4-Aminophenyl)-hexan-2,4-dion):



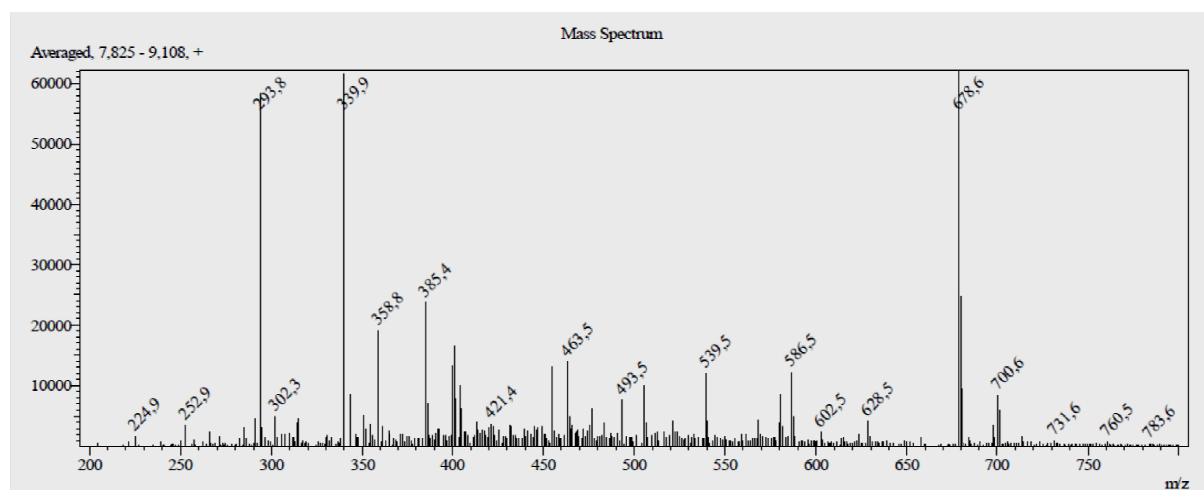
Massenspektrum zu Abbildung zu Abbildung 4.4.4.C:



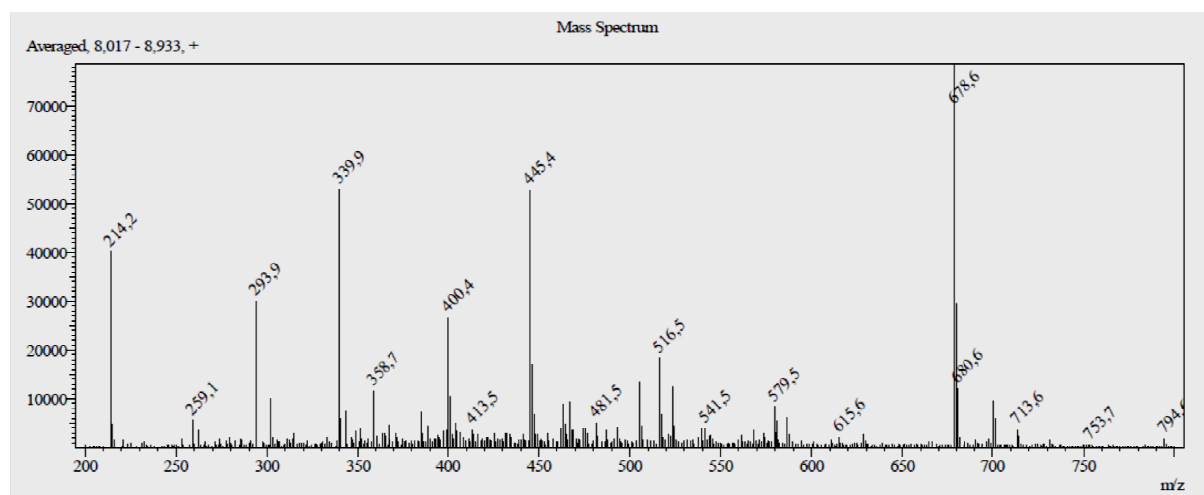
Massenspektrum zu Abbildung 4.4.6. 1 und 2:



Massenspektrum zu Abbildung 4.4.6. 3 und 4:



Massenspektrum zu Abbildung 4.4.6. 5 und 6:



9.4. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ich erkläre hiermit auch, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.